IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE BEIM NIERENKARZINOM

Johannes Kühn

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0010

Aus der Medizinischen Klinik II Klinikum Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE BEIM NIERENKARZINOM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Johannes Kühn
aus München
München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lamerz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. 10. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	E I N L E I T U N G	1
2	H A U P T T E I L	
2.1	ADENOKARZINOM DER NIERE (NIERENKARZINOM, HYPERNEPHROM, HYPERNEPHROIDES NIERENKARZINOM)	
	Überblick über die Nierentumoren	3
	Geschichte	3
	Epidemiologie und Ätiologie	4
	Pathologie	5
	Stadieneinteilung	7
	Klinik	7
	Diagnose	10
	Therapie und Prognose	11
2.2	FREMDUNTERSUCHUNGEN ÜBER TUMORANITGENE DES NIERENKARZINOMS	
	Immune Surveillance	13
2.2.1	TUMOR - ASSOZIIERTE ANTIGENE	
	Überblick	16
2.2.1.1	Tumorassoziierte Antigene im Humansystem	18
	Histologisch kreuzreagierende Antigene	19
	Virus-assoziierte Antigene	19
	Onkofetale Antigene	20
2.2.2	TUMORIMMUNOLOGISCHE PROZESSE BEI PATIENTEN MIT NIERENKARZINOM	
	Nachweis tumorimmunologischer Prozesse	25
	Delayed Hypersensitivity (DTH)	26
	Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI)	27
	Lymphozytenaktivierung	30
	Zytotoxizitätstests	30
2.2.3	EIGENSCHAFTEN VON TUMOR - ASSOZIIERTEN ANTIGENEN DES NIERENKARZINOMS : EXPERIMENTELLE DATEN	33

2.3 E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

2.3.1 U N T E R S U C H U N G S M A T E R I A L

2.3.1.1 ZUR METHODIK VERWANDTES MATERIAL

Tumor- (Normalgewebs-) Quelle 37
Antiseren 37

2.3.1.2 UNTERSUCHTES PATIENTENGUT

2.3.1.2.1 CEA

Normalkollektiv 38
Patientenkollektiv 38

2.3.1.2.2 AFP

Normalkollektiv 39
Patientenkollektiv 39

2.3.1.2.3 Ferritin 40

2.3.2 M E T H O D I K

2.3.2.1 ANALYTISCHE VERFAHREN

Gesamt-Eiweiß 41
CAF-Elektrophorese 41
Immunelektrophorese 41
Zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY 42

Radioimmunoassay
Markierung 42
Reinigung des ^{125}J-markierten Proteins 43
Testung des ersten Antikörpers 44
Standard-Inhibitionskurve 46

Immunoradiometrische Bestimmung von Ferritin im Serum 48

2.3.2.2 PRÄPARATIVE VERFAHREN

2.3.2.2.1 Gewebe-Extraktion

2.3.2.2.1.1 Herstellung von salinen Gewebe-Extrakten 49
2.3.2.2.1.2 Herstellung von Perchlorsäure-Extrakten aus Tumorgewebe 50
2.3.2.2.1.3 Zentrifugation 51
2.3.2.2.1.4 Filtration 51

2.3.2.2.1.5	Konzentrierung	52
2.3.2.2.1.6	Lyophilisation	52
2.3.2.2.2	Karton-Elektrophorese	53
2.3.2.2.3	Chromatographie	
2.3.2.2.3.1	Gelfiltration	53
2.3.2.2.3.2	DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher	55
2.3.2.2.3.3	Immunadsorption	56
2.3.2.2.3.4	Konzentrierung	58
2.3.2.3	HERSTELLUNG VON ANTISEREN	
	Immunisierung	59
	Absorption	60
2.3.2.4	BERECHNUNGEN	
	Methodische Auswertung des Radioimmunoassays	62
	Statistische Berechnungen	63
2.3.3	E I G E N E E R G E B N I S S E	
2.3.3.1	METHODISCHER TEIL	
2.3.3.1.1	Gewebe-Extraktion	64
2.3.3.1.2	Gelfiltration	71
2.3.3.1.3	Immunadsorption	75
2.3.3.1.4	Antiseren	77
2.3.3.1.5	Partielle Reinigung von Tumor-assoziierten Proteinen	
2.3.3.1.5.1	Mit Ferritin kreuzreagierendes Antigen	79
2.3.3.1.5.2	Mit Lactoferrin kreuzreagierendes Antigen	84
2.3.3.1.5.3	Weiteres, nicht näher charakterisiertes Protein	85
2.3.3.1.6	Radioimmunoassays	
	CEA-RIA	87
	AFP-RIA	87
2.3.3.2	KLINISCHER TEIL	
2.3.3.2.1	CEA-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom	
	Normalwerte	88
	Werte bei Nierenkarzinom	88

2.3.3.2.2	AFP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom	
	Normalwerte	95
	Werte bei Nierenkarzinom	95
2.3.3.2.3	Ferritin-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom	
	Normgrenze	95
	Werte bei Nierenkarzinom	95
2.3.4	D I S K U S S I O N	
2.3.4.1	METHODISCHER TEIL	
2.3.4.1.1	Gewebe-Extraktion	
	Nierenkarzinom-Extrakte	98
	Extrakte aus normalem Nierengewebe	99
2.3.4.1.2	Gelfiltration und Immunadsorption	100
2.3.4.1.3	Antiseren	102
2.3.4.1.4	Partielle Reinigung von Tumor-assoziierten Proteinen	
2.3.4.1.4.1	Ferritin	104
	Struktur	104
	Gewebespezifität und Heterogenität	105
	Ferritin in Tumorzellen	106
2.3.4.1.4.2	Lactoferrin	107
2.3.4.1.4.3	Weiteres, nicht näher charakterisiertes Protein	111
2.3.4.2	KLINISCHER TEIL	
2.3.4.2.1	CEA-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom	112
2.3.4.2.2	AFP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom	115
2.3.4.2.3	Ferritin-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom	115
2.3.4.3	Ausblick	118
3	Z U S A M M E N F A S S U N G	120
4	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	122

Abkürzungen

AFP	Alpha-Fetoprotein
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovine Serum Albumin
BSG	Blutkörperchen-Senkungs-Geschwindigkeit
CEA	Carcinoembryonales Antigen
DNCB	Dinitrochlorbenzol
DTH	Delayed Type Hypersensitivity Reaction
FRA	Fetorenales Antigen
Hb	Hämoglobingehalt in g/100 ml
HB-Ag	Hepatitis-B Antigen
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HD	Herddosis
HE	Herddosis zur präoperativen Kurzzeitbestrahlung (z.B. 4 x 400 rd HD innerhalb von 2 Tagen bei Nierenmalignomen)
HE 7/75	Saliner Hypernephromextrakt (Extraktion: Juli 1975)
HE 2a/76	Saliner Hypernephromextrakt (Extraktion: Febr. 1976)
HE 2b/76	Perchlorsäureextrakt aus Hypernephromgewebe
LMCT	Leucocyte Migration Capillary Tube Technique
LMI	Leucocyte Migration Inhibition
MIF	Mycrophage Inhibition Factor
MLTC	Mixed Lymphocyte Tumor Cell Culture
MMI	Macrophage Migration Inhibition
NNE 7/75	"Normaler Nierenextrakt", Extrakt aus dem "Normalanteil" der Tumornieren
NNE 3/76	Normaler Nierenextrakt aus einer Unfallniere
NS	Normalserum
PCA	Perchloric Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phythohämagglutinin
RIA	Radioimmunoassay
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TATA = TSTA	Tumor-assoziierte Transplantationsantigene
SSW	Schwangerschaftswoche
VEA	Virally associated envelope antigens

1 E I N L E I T U N G

Die Anfänge der Tumorimmunologie, die heutzutage einen Schwerpunkt innerhalb der immunologischen Forschung einnimmt, lassen sich bis zur Jahrhundertwende zurückverfolgen, zu der man bereits versucht hatte, eine immunologische Krebsdiagnostik und -therapie aufzubauen. Denn klinische Beobachtungen, etwa die spontane Rückbildung von Metastasen, sowie morphologische Befunde, z.B. die Infiltration des Tumorgewebes mit Lymphozyten, machten Abwehrmechanismen gegen Neoplasmen beim Menschen wahrscheinlich. So zeigte die experimentelle Tumorforschung gegen Ende des 19. Jahrhunderts, daß tierische Tumoren von einem Tier auf ein anderes übertragbar waren, das erfolgreiche und dauerhafte Angehen dieser Transplantate jedoch eher die Ausnahme als die Regel war. Als Ursache der kurzfristig einsetzenden regressiven Veränderungen des Transplantates erkannte man immunologische Abwehrvorgänge.
Inzwischen besteht kein Zweifel mehr, daß Immunreaktionen bei der Tumorabwehr eine bedeutende, wenn nicht sogar entscheidende Rolle spielen. Trotz umfangreicher Studien müssen jedoch auch heute noch Wesen und Bedeutung dieser Immunantwort als weitgehend ungeklärt angesehen werden, und die erklärten Ziele der klinischen Forschung, Techniken für die Frühdiagnostik und die prognostische Beurteilung maligner Erkrankungen zu entwickeln und eine Immuntherapie durchzuführen, wurden bislang nicht erreicht.

Die Annahme einer Tumorabwehr impliziert die Existenz Tumorspezifischer und/oder Tumor-assoziierter Antigene, die Normalzellen nicht besitzen. Die Charakterisierung dieser antigenetischen Differenzen wurde im wesentlichen einerseits durch Induktion und Analyse von Immunreaktionen gegen autologe Tumorzellen und andererseits mit serologischen Methoden versucht, von denen die Herstellung xenogener Antiseren gegen Malignomgewebe die weiteste Verbreitung gefunden hat. Unter Anwendung

dieses Verfahrens gelang die Isolierung der bislang bekanntesten Vertreter humaner Tumor-assoziierter Antigene, des AFP und des CEA.

Diese Technik wurde auch für die vorliegenden Untersuchungen über das Nierenkarzinom herangezogen, das bekanntlich auf Grund des Fehlens charakteristischer Frühsymptome eine besonders heimtückische, jahrelang "stumm" verlaufende Erkrankung darstellt. Ziel war es, in diesem Malignom nach Tumor-assoziierten Proteinen zu fahnden und damit eventuell zusätzliche Diagnose- bzw. Verlaufsparameter an die Hand zu bekommen. Im einzelnen sollten

- durch Immunisierung von Kaninchen Antikörper gegen verschiedene gepoolte menschliche Nierenkarzinompräparationen sowie deren Einzelfraktionen nach gelchromatographischer Auftrennung hergestellt werden, die nach adäquater Absorption mit Normalserum und Normalgewebsbestandteilen noch tumorspezifische Reaktionen erkennen ließen,
- radioimmunometrische Einzel- und Verlaufsmessungen einer solchen Substanz im Serum von Nierenkarzinom-Patienten klären, ob hierdurch im Vergleich zur Bestimmung der bekannten Tumormarker AFP und CEA prägnantere Aussagen über Ausbreitung und Verlauf des malignen Prozesses unter Therapie getroffen werden können.

2 H A U P T T E I L

2.1 ADENOKARZINOM DER NIERE (NIERENKARZINOM , HYPER - NEPHROM , HYPERNEPHROIDES NIERENKARZINOM)

Überblick über die Nierentumoren (8, 25, 50)

Die Tumoren des Nierenparenchyms werden sowohl nach den Gesichtspunkten der Dignität in benigne (Häufigkeit unter den Nierentumoren: 10 - 15%) und maligne als auch nach den Kriterien der geweblichen Herkunft in epitheliale, mesenchymale und Misch-Tumoren eingeteilt (8, 25).

Unter den benignen Geschwulstformen sind wegen ihrer relativen Häufigkeit besonders beim männlichen Geschlecht ein epithelialer Typ, nämlich die tubulären oder papillären Nierenrindenadenome zu nennen, die je nach den diese Tumoren bildenden Zellen in basophile und eosinophile sowie onkozytäre Adenome unterteilt werden und nach heute vorherrschender Ansicht als Ausgangspunkt der Nierenkarzinome gelten. Daneben spielen die unterschiedlich häufigen benignen mesenchymalen Tumoren (Fibrome des Markes, Leiomyome der Rinde, Chondrome, Haemangiome, besonders der Nierenhilusregion sowie benigne mesenchymale Mischtumoren) wegen ihrer meist geringen Größe eine untergeordnete Rolle. Gewöhnlich werden sie daher zufällig bei der Obduktion entdeckt.

Unter den malignen Neubildungen kommt nach dem Nierenkarzinom (s. unten) dem Adenosarkom der Niere (Nephroblastom, Wilms' Tumor) mit einem Anteil von ca. 9% (16) und einem Häufigkeitsgipfel im zweiten und dritten Lebensjahr (gelegentlich schon bei Neugeborenen, selten bei Erwachsenen) (197) die größte Bedeutung zu. Histologisch besteht es meist aus einer Mischung von mesenchymalen und fetal epithelialen Zellen.

Geschichte

Der Name Hypernephrom bzw. Hypernephroides Nierenkarzinom

geht auf die inzwischen nicht mehr vertretene These von P. GRAWITZ (75) zurück, nach der intrarenale Nebennierenreste (sog. versprengte Nebennierenrindenkeime oder Choristome) für das Entstehen der Nierenkarzinome verantwortlich gemacht wurden. Auch die Einteilung in benigne (Tumoren unter 3 cm Durchmesser = Hypernephrom) und maligne (Tumoren über 3 cm Durchmesser = hypernephroides Karzinom) Varianten (189, 190) ist strittig und z.B. in der angloamerikanischen Literatur seit langem nicht mehr gebräuchlich. Stattdessen hat sich in zunehmendem Maße die Bezeichnung "Nierenkarzinom" (renal cell carcinoma) bzw. "Adenokarzinom der Niere" durchgesetzt (8,25,50).

Epidemiologie und Ätiologie (8, 16, 25, 32)

Die Malignome des Nierenparenchyms machen etwa 1,2% aller bösartigen Tumoren aus, wobei dem Nierenkarzinom mit 89% (ca. 1% aller Malignome) die bei weitem größte Bedeutung zukommt. Seine Verteilung männlich : weiblich wird üblicherweise mit 2 : 1 angegeben, bei Bezug der Morbidität auf den jeweiligen Anteil des Geschlechtes in der Gesamtbevölkerung ergibt sich jedoch sogar ein Verhältnis von 3 : 1 (16, 187). Bevorzugt tritt es zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr auf, Kinder erkranken nur extrem selten (32). Familiäre Häufungen sind kaum beschrieben (16) und eigentlich nur im Falle der v. HIPPEL-LINDAU' schen Angiomatose des ZNS (Kombination von Angiomatose der Retina und kapillärem Hämangiom des Kleinhirns mit dominantem Erbgang; ca. 2/3 der Patienten bekommen ein Nierenkarzinom) faßbar (16, 215).
Die Ätiologie ist unbekannt. Über das gelegentliche Vorkommen spontaner Tumoren in einigen Spezies des Tierreiches, deren histologisches, histochemisches und elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild dem menschlichen Adenokarzinom der Niere sehr ähnelt, ist wiederholt berichtet worden (16, 77); außerdem lassen sich solche Tumoren im Tiermodell durch eine Reihe von chemischen (aromatische Kohlenwasserstoffe und Amine, aliphatische Verbindungen wie Urethan und Dimethyonitrosamin, Aflatoxin, Östrogene, Blei) und physikalischen Agentien sowie durch Viren induzieren (16, 22, 77, 102). Ob diese Substanzen auch in der

Nieren-Karzinogenese beim Menschen eine Rolle spielen, ist bis heute nicht bewiesen, jedoch in einigen Fällen wie z.B. dem Dimethylnitrosamin wahrscheinlich. So soll das Erkrankungsrisiko bei Zigarettenrauchern gegenüber Nichtrauchern um den Faktor 5, bei Zigarrenrauchern sogar um den Faktor 12,9 höher liegen (15). Und obwohl sich Nierenkarzinome durch Östrogene eindeutig nur bei Hamstern auslösen lassen, wird doch über den gelegentlich erfolgreichen Einsatz von Progesteron sowie von Antiöstrogenen in ihrer Therapie beim Menschen, vor allem bei Männern, berichtet (16, 22, 102).

Pathologie (8, 16, 25, 148, 190, 203)

Als Entstehungsort des Nierenkarzinoms werden heute auf Grund von elektronenoptischen Untersuchungen die Tubuluszellen des proximalen Konvolutes angesehen.
Makroskopisch fallen die meist runden, scharf begrenzten Tumoren, die sich häufig unilateral in einem der Nierenpole, aber auch im Nierenzentrum entwickeln, durch ihr buntes Aussehen mit graugelber bis rot-gelb gefleckter Schnittfläche und oft erkennbarer Zystenbildung auf; die gelbe Farbe erklärt sich durch den hohen Lipidreichtum des Gewebes, rote Areale kommen durch Blutungen aus den Gefäßen des Tumors in das angrenzende Parenchym zustande.
Vom histologischen Aspekt her unterscheidet man im wesentlichen zwei Erscheinungsformen, die früher häufig als hypernephroides Karzinom bzw. Adenokarzinom bezeichnet wurden, heute jedoch als verschiedene Differenzierungsgrade eines Tumors aufgefaßt werden: den klarzelligen Typ (hypernephroides Ca.), der aus glykogen- und lipidreichen, aber wenig Organellen enthaltenden Zellen mit hellem, oft pflanzenartigem Zytoplasma zusammengesetzt ist, sowie den granulärzelligen Typ (Adeno-Ca.), bestehend aus glykogen- und lipidarmen Zellen, die jedoch einen hohen Gehalt an Organellen aufweisen. Unabhängig davon sind die Tumorzellen in eher tubulären, papillomatösen, trabekelartigen, soliden oder zystischen Mustern angeordnet und von einem dichten Netz kapillärer Gefäße umgeben. In seltenen Fällen (1,8% aller Nierenkarzinome) weist der Tumor eine sarkomatoide Konfiguration

auf, die an ein Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom oder Liposarkom erinnert. Mit Ausnahme dieses Typs, der außerordentlich aggressiv ist, korreliert das histologische Bild nur unzureichend mit der Prognose.

Ob es von diesem Tumor eine benigne Variante gibt, ist, wie bereits angedeutet, sehr umstritten und nach Meinung eines Großteils der Autoren überholt. Zwar findet man bei der Obduktion gelegentlich relativ kleine sogenannte Hypernephrome, die nicht metastasiert haben; dennoch verweisen viele Untersucher immer wieder auf Beobachtungen, denen zufolge eine Metastasierung einerseits bei solch kleinen Tumoren ($\varnothing < 2$ cm) bereits eingetreten, andererseits bei sehr großen Neoplasmen ($\varnothing > 10$ cm) noch ausgeblieben war. Da auch vom histologischen Aspekt her keine Kriterien zur Unterscheidung der beiden Varianten existieren, halten diese Autoren ihre Zusammenfassung unter dem Begriff "Nierenkarzinom" gerechtfertigt, ein Terminus, in den sogar gelegentlich das Nierenrindenadenom einbezogen wird (16).

Mit zunehmendem Wachstum des Tumors kommt es zur Kompression und Verdrängung der benachbarten Kelche, Blutgefäße und des Nierenbeckens sowie zum Einbruch häufig in die Nierenvenen (29 - 54%), seltener in die Vena cava inferior (9,5%), mit konsekutiver hämatogener Metastasierung über das pararenale und paravertebrale venöse Verbundsystem.

Die lymphogene Metastasierung erfolgt vor allen Dingen über die Lymphgefäße des Nierenstiels sowie die regionalen parakavalen, paraaortalen und iliakalen Lymphknoten.

In 28% der Fälle kommt es zur lokalen Ausbreitung des Tumors in die Nierenkapsel und das perirenale Fettgewebe mit gelegentlicher Verdrängung oder Infiltration von Nachbarorganen (Magen, Duodenum, Pankreas, Milz, Leber, Zwerchfell).

Fernmetastasen bilden sich am häufigsten in der Lunge (50 - 56%), gleichfalls häufig in Knochen (33 - 40%), Leber (30 - 35%), regionalen Lymphknoten (22 - 40%) und Nebennieren (10 - 24%). Seltener finden sie sich im Gehirn (6%), in der Milz (5%) oder in der Haut (3%).

Stadieneinteilung (95)

Das Nierenkarzinom wird heute präoperativ nach den Regeln der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) klassifiziert (TNM - System). Eine genaue Darstellung dieser Einteilung unter Einbezug der Histologie sowie eines Diagnosesicherungsschlüssels findet sich unter anderem bei HOFSTETTER (95). In Tabelle 1 ist nur eine vereinfachte Form wiedergegeben.

Klinik (8, 50, 96, 148, 215)

Auf Grund des Fehlens charakteristischer Frühsymptome wird die Diagnose "Nierenkarzinom" meist erst spät gestellt. Bei ca. 30% aller Patienten bestehen die ersten Manifestationen in systemischen Tumorauswirkungen wie Gewichtsverlust, Schwäche, Anämie, und nicht selten lenken erst Beschwerden von Seiten der Metastasen (z.B. Reizhusten oder Atembeschwerden bei Lungenmetastasen, Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen) den Verdacht auf die richtige Diagnose. Nur in 10 - 15% der Fälle findet man die klassische Trias "Makrohämaturie, Flankenschmerz und palpabler Tumor" in ihrer vollständigen Ausbildung, und 47% dieser Kranken haben bereits Fernmetastasen. Insgesamt trifft man bei 30% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Metastasen an (96, 196).
Die einzelnen Symptome können sowohl auf lokalen als auch systemischen Tumoreffekten beruhen.
Lokale Effekte: Die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie, das mit 60 - 80% am häufigsten anzutreffende Symptom, signalisiert den Einbruch des Tumors in das Nierenbeckenkelchsystem und ist in der Regel kein Frühzeichen mehr. Schmerzen (ca. 50%) können in Form von dumpfen Druckdolenzen als Folge einer Harnstauung bei karzinombedingter Harnleiterkompression oder als Koliken bei Eintritt von Blutkoagel bzw. Tumorbrökeln in den Ureter vorkommen. Eine palpable Geschwulst (ca. 33%) läßt sich meist erst spät nachweisen (außer bei dünnen Patienten, deren Tumor im unteren Nierenpol entstanden ist) und verschlechtert im Falle ihrer Fixierung auf der Unterlage die Prognose erheblich.
In fortgeschrittenen Stadien kann als Folge einer Verlegung

Tabelle 1

TUMOR - KLASSIFIKATION NACH DEM T'N M - SYSTEM

T	=	Primärtumor
T_X	=	Minimalforderung zur Beurteilung der Tumorgröße nicht gegeben
T_0	=	Kein Primärtumor nachweisbar
T_1	=	Kleiner Tumor ohne Vergrößerung der Niere, geringe Deformierung des Kelchsystems, umschriebene Gefäßveränderungen umgeben von Parenchym
T_2	=	Ausgedehnter Tumor mit Verformung oder Vergrößerung der Niere, Einbruch in das Kelchsystem oder Nierenbecken. Angiographisch Kontinuität der Niere erhalten
T_3	=	Tumor infiltriert bereits perirenales, peripelvines Fettgewebe oder den Nierengefäßstiel
T_4	=	Befall benachbarter Organe oder der Bauchwand
N	=	Regionale (paraaortale und parakavale) und juxtaregionale (Lymphknoten des Beckens und Mediastinums) Lymphknoten
N_X	=	Minimalforderungen für eine Beurteilung nicht erfüllt
N_0	=	Kein Befall der regionalen Lymphknoten
N_1	=	Befall eines einzelnen homolateralen, regionalen Lymphknotens
N_2	=	Befall kontralateraler oder bilateraler oder mehrerer regionaler Lymphknoten
N_3	=	Fixierte regionale Lymphknoten (nur intraoperativ beurteilbar)
N_4	=	Befall von juxtaregionalen Lymphknoten
M	=	Fernmetastasen (alle Metastasen außerhalb der regionalen und juxtaregionalen Bereiche sowie Befall des Knochens)
M_X	=	Minimalforderung für eine Beurteilung nicht gegeben
M_0	=	Fernmetastasen nicht nachweisbar
M_1	=	Fernmetastasen vorhanden, und zwar:
	M_{1a}	= Nachweis okkulter Metastasen durch biochemische oder andere Tests
	M_{1b}	= Einzelmetastase in einem einzelnen Organ
	M_{1c}	= Multiple Metastasen in einem einzelnen Organ
	M_{1d}	= Metastasen in verschiedenen Organen

der Einmündungsstelle der linken Vena testicularis (mündet in

die linke Vena renalis) eine akute Hydrozele oder Varikozele auftreten, Varizenbildung in der Bauchwand (Caput medusae) und Ödeme der unteren Extremitäten zeigen einen Tumoreinbruch oder eine Tumorthrombose der Vena cava inferior an. Schließlich vermögen in vereinzelten Fällen massive arterio-venöse Fisteln des Malignoms mit sehr großen Shuntvolumina eine Volumenhypertonie mit eventueller konsekutiver Herzinsuffizienz zu provozieren.

Systemische Effekte: Im folgenden soll eine Übersicht über die wichtigsten systemischen Tumorzeichen gegeben werden (96):

BSG-Erhöhung	55,6%
Anämie	41,3%
Tumorkachexie, Gewichtsverlust, Müdigkeit	34,5%
Fieber (leicht)	17,2%
Leberfunktionsstörungen (s. unten)	15,0%
Erhöhte alkalische Phosphatase	10,1%
Polyneuritis, Myopathien	3,0%
Amyloidose (Leber,Niere,Milz,Nebennieren)	2,1%
Pseudohyperparathyreoidismus	5,7%
Sekundäre Polyglobulie	3,7%
Hypertonie (150/100)	37,6%

Fieber in Form von intermittierenden, leichten, oft lang anhaltenden Temperaturschüben ist eine häufige Begleiterscheinung des Nierenkarzinoms und kann mit einer mäßigen Leukozytose und eventuell sogar einer leukämoiden Reaktion des peripheren Blutbildes einhergehen. Die Ursache der Anämie mag in einem Erythropoietindefizit oder auch in einer toxischen Knochenmarksdepression zu suchen sein.
Unter den gastrointestinalen Erscheinungen sei in erster Linie die sog. nephrogene Hepatopathie (206) mit deutlichen Leberfunktionsstörungen (pathologische Bromsulphthaleinretention, Erhöhung der $Alpha_2$-Globuline und der alkalischen Phosphatase, Hypalbuminämie, verlängerte Prothrombinzeit) und gelegentlicher Hepatosplenomegalie unabhängig von metastatischen Absiedlungen in diesem Organ angeführt, die in einem Teil der Fälle histologisch mit dem Bild einer unspezifisch reaktiven Hepatitis korreliert, allerdings für ein Nierenkarzinom nicht pathogno-

monisch ist (227). Nur sehr selten wurde auch eine Art exsudativer Enteropathie beschrieben.
Von der in 3 - 5% der Fälle auftretenden generalisierten Amyloidose sind vorwiegend Leber, Niere, Milz, Nebenniere und Myokard betroffen. Als Ursache der manchmal beobachteten Neuromyopathie (periphere Myopathie, Polyneuritis, Muskeldystrophie) werden Autoantikörper gegen Nervengewebe diskutiert.
Die endokrinen Komplikationen sind Ausdruck paraneoplastischer Syndrome und umfassen eine sekundäre Polyglobulie (normale Leukozyten- und Thrombozytenwerte), die mit einer Erythropoietinproduktion durch den Tumor erklärt wird, einen Pseudohyperparathyreoidismus mit Hyperkalziämie und Hypophosphatämie (Produktion einer parathormonähnlichen Substanz) sowie gelegentlich ein SCHWARZ-BARTTER-Syndrom mit Hyponatriämie (inadäquate ADH-Produktion). Auch Gonadotropin-produzierende Malignome kommen vor (sehr selten) (96).
Die relativ häufige Hypertonie beruht in der Regel auf einer zufälligen Koinzidenz (Durchschnittsalter der Patienten!), ihr kann jedoch auch eine Obstruktion bzw. Kompression intrarenaler Arterien durch den expandierenden Tumor mit Ischämie und konsekutiver Reninausschüttung oder eine Freisetzung vasoaktiver Substanzen durch das Karzinom zugrunde liegen.

Diagnose (24, 50, 203, 215, 216)

BSG, Blutbild, Kreatinin, leberspezifische Enzyme, alkalische Phosphatase, Ca^{++} und Serumelektrophorese sind zu überprüfen. Ein erhöhtes Serum-Alpha$_2$-Haptoglobin kann bei Ausschluß entzündlicher Erkrankungen eventuell als Indiz für das Vorliegen von Metastasen gewertet werden (18, 219).
Die Sicherung der Diagnose erfolgt in der Regel durch die Abdomenübersichtsaufnahme (Zeichen eines raumfordernden Prozesses im Bereich einer Niere) und das Ausscheidungsurogramm (Deformierung des Nierenbeckenkelchsystems, evtl. Verlagerung des Ureters), das gegebenenfalls durch eine Urethrozystoskopie mit retrograder Sondierung (stumme Niere) ergänzt wird. Die Sonographie (vor allem bei gefäßarmen Tumoren) und die selektive Nierenangiographie ("Kontrastmittelpfützen", "Blutseen" bei Nierenkarzinom) ermöglicht die Differentialdiagnose gegenüber

einer Zyste, die letztere gibt zusätzlichen Aufschluß über Gefäßversorgung, Größe und Ausdehnung des Tumors. Die Ganzkörper-Computer-Tomographie kann unter Umständen Zusatzinformationen über regionale Lymphknoten, Verdrängung oder Infiltration von Nachbarorganen sowie Lebermetastasen liefern (222).
Die Kavographie und Nierenphlebographie weisen auf geschwulst- bzw. metastasenbedingte Gefäßkompressionen, Verlagerungen sowie auf partiellen oder totalen Verschluß der Vena cava inferior bzw. der Nierenvenen durch Tumorzapfen hin. Die Lymphographie hat nur eingeschränkten Aussagewert, da sich die regionalen Lymphknoten am Nierenhilus der Diagnose entziehen können. Eine Funktionsszintigraphie sollte zur Beurteilung der Funktion der kontralateralen Niere angefertigt werden.
Dem Nachweis von Fernmetastasen dienen Röntgenaufnahmen von Thorax und Skelett, weiterhin Szintigraphie von Leber und Gehirn sowie eventuell die Zöliakographie (Lebermetastasen).
Differentialdiagnostisch erwogen werden müssen: Solitärzyste, polyzystische und multizystische Nierendegeneration, Hydronephrosen, Nierentuberkulose, Nebennierengeschwülste (Neuroblastom, Phäochromozytom) und Angiomyelolipome (M. PRINGLE-BOURNEVILLE).

Therapie und Prognose (50, 203)

Die Therapie der Wahl besteht heute in der radikalen Nephrektomie sowie in einer prä- und postoperativen Bestrahlung, auch wenn deren Wert z.T. noch umstritten ist und im übrigen für die einzelnen Stadien der Erkrankung nicht einheitlich angegeben wird (169, 224). Vor dem chirurgischen Eingriff erfolgt die Applikation von 1200 - 2000 rad HE innerhalb von zwei Tagen zur Devitalisierung von Geschwulstzellen und zur Vermeidung der Gefahr einer Verschleppung intraoperativ mobilisierter Tumorzellen. Anschließend wird die transperitoneale, wenn nötig thorakoabdominale en-bloc-Entfernung des Tumors mit perirenaler Fettkapsel, der Nebenniere und dem Harnleiter sowie der Testicularis- bzw. Ovarikagefäße unter Mitnahme aller parakavalen und paraaortalen Lymphknoten durchgeführt. Eventuelle Tumorzapfen in der Vena cava inferior bzw. in den Nierenvenen sind

ebenfalls auszuräumen. Nachbestrahlt wird mit einer HD von 3000 - 4000 rad innerhalb von sechs Wochen.
Dieses Vorgehen wird angesichts der Zytostatikaresistenz des Nierenkarzinoms (28) z.T. (203) auch bei Vorliegen von Fernmetastasen empfohlen; andere Studien verneinen eine Verbesserung der Überlebenschance hierdurch (169).
Bei Inoperabilität zeitigt die Therapie mit Gestagenen (z.B. Depostat, 2 x wöchentlich 200 mg i.m. über 6 Wochen) noch die besten Ergebnisse (22, 28, 203). Der Einsatz von Zytostatika kann versucht werden, ist jedoch meist wirkungslos. Rezidivierende Hämaturien lassen sich in inoperablen Fällen eventuell durch eine transarterielle Embolisierung beseitigen.
Erste Ansätze zu einer Immuntherapie, z.B. in Form der systemischen Immunstimulation bzw. der "adjuvant cantact therapy" unter Verwendung von BCG und Corynebacterium parvum (31, 140) oder als intrakutane Applikation von gereinigter Schafs-RNA nach vorangegangener Immunisierung der Tiere mit lebenden Nierenkarzinom-Zellen (56, 174, 178) befinden sich noch im Versuchsstadium. Sie beruhen auf gelegentlichen Berichten über langwierige Verläufe bei z.T. sogar unbehandelten Patienten, das Auftreten von Metastasen erst 25 Jahre nach erfolgter Tumornephrektomie sowie allerdings sehr seltene Spontanregressionen (22, 52, 53, 180) und den hieraus resultierenden und durch klinische Untersuchungen gestützten Vorstellungen von immunologischen Beziehungen zwischen Tumor und Wirt (9) (s. unten).

Abgesehen von diesen Fällen ist die Prognose in der Regel schlecht. Im folgenden sei eine Aufstellung der 5 - Jahresüberlebensrate bei den einzelnen (histologisch verifizierten) T-Kategorien (TNM-System) gegeben (224):

T_1		90%
T_2	(ohne Metastasen)	60%
T_3	(ohne Metastasen)	
	vollständige Tumorexcision möglich	37%
	unvollständige Tumorexcision	19%
	(mit Metastasen)	
	vollständige Tumorexcision möglich	4%
	unvollständige Tumorexcision	0%

2.2 FREMDUNTERSUCHUNGEN ÜBER TUMORANTIGENE DES NIERENKARZINOMS

Immune Surveillance

Bei kritischer Beurteilung stellt die spontane Rückbildung bösartiger Neoplasien ein außerordentlich seltenes Ereignis dar. So umfaßt eine Sammlung aller einigermaßen stichhaltigen Beobachtungen zwischen 1900 und 1965 lediglich 176 Fälle (52, 53); davon machen allerdings vier Krebstypen mehr als die Hälfte aus: Maligne Melanome, Nierenkarzinome (26 Fälle, nach anderen Untersuchungen 38 Fälle zwischen 1900 und 1970) (22), Neuroblastome und Choriokarzinome. Müssen diese Vorkommnisse als Hinweise auf Abwehrleistungen des menschlichen Organismus gegen Krebs gewertet werden? So wurde einerseits die Seltenheit solcher Spontanremissionen gelegentlich als Argument gegen eine nennenswerte Rolle von Immunreaktionen benutzt. Andererseits ist es jedoch unzulässig, aus der Spätphase Rückschlüsse auf die Vorgänge während der Frühphase zu ziehen (209). Und zahlreiche Untersuchungen sprechen dafür, daß immunologische Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirt häufig, vielleicht sogar die Regel sind (42, 79, 82, 90, 105, 120, 121, 156, 157, 158, 207), auch wenn ihre ursächliche Beteiligung an den vereinzelten Spontanregressionen bis heute nicht bewiesen ist (31).

Obwohl tumorspezifische Reaktionen schon seit dem späten 19. Jahrhundert bekannt sind, konnten erste konkrete Hinweise auf das gegenüber dem entsprechenden Normalgewebe abweichende Antigenprofil von malignen Zellen, das ihre Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem ermöglichen sollte, erst gewonnen werden, nachdem die Grundlagen der Transplantationsimmunologie bekannt und syngene Tierstämme verfügbar waren. So demonstrierte FOLEY (59) 1953 an Inzuchtmäusen die spezifische Abstoßung eines syngenen Methylcholantren-induzierten Sarkoms durch Tiere, die vorher gegen diesen Tumor immunisiert worden waren. Diese Immunogenität von experimentellen Tumoren im Tiermodell wurde durch weitere Untersuchungen abgesichert

und führte zu der Annahme, daß maligne Zellen spezifische Transplantationsantigene (TATA = Tumor-assoziierte Transplantationsantigene) besäßen und somit Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus provozierten. Die nicht unumstrittene "immune surveillance"-Theorie (30) postuliert sogar die ständige Entwicklung solcher entarteter Zellen, die jedoch durch das Immunsystem als anders erkannt und eliminiert würden. Folgerichtig sollte das Auftreten von Krebs in umgekehrt proportionaler Beziehung zur Immunkompetenz des Wirtes stehen, d.h. bei nachstehend aufgeführten Personengruppen wäre eine erhöhte Inzidenz an Malignomerkrankungen zu erwarten: 1. Patienten mit hereditären Defektimmunopathien oder einer anderweitigen permanenten bzw. passageren Immuninsuffizienz, insbesondere dann, wenn die zelluläre Immunabwehr involviert ist, 2. immunsuppressiv behandelten Patienten, 3. greisen Menschen, deren fortgeschrittenes Alter mit einer "Schwäche" der Immunabwehr zu vereinbaren wäre, sowie sehr jungen Individuen mit einem noch unreifen Immunsystem.
Ob dieses Konzept in der beschriebenen Form Gültigkeit besitzt, ist zumindest fraglich. 1. So konnte ein erhöhtes Malignomerkrankungsrisiko infolge einer Immuninsuffizienz fast ausschließlich für das lymphoretikuläre System nachgewiesen werden. Und bei immunsuppressiv behandelten Patienten war ein gehäuftes Auftreten von Neoplasien zwar feststellbar, wenn sie diese Therapie im Anschluß an eine Organtransplantation erhalten hatten (ungehemmte Lymphozytentransformation in Anwesenheit der Fremdantigenmasse als Ursache?), nicht jedoch, wenn sie sie aus anderen Gründen (z.B. verschiedene lymphatische Erkrankungen) bekamen (61, 141). In Übereinstimmung hiermit fanden z.B. McLAUGHLIN et al. in Versuchen an Inzuchthamstern keine Beeinflußbarkeit von Entwicklung und Wachstum eines östrogeninduzierten Nierenkarzinoms durch immunsuppressive Maßnahmen (143). 2. Obwohl Untersuchungen neueren Datums auf eine partiell geminderte Funktionsfähigkeit der Immunabwehr in alternden Menschen hindeuten (81, 132, 133, 200), läßt sich eine solche zumindest in generalisierter Form bei sehr jungen bzw. alten Individuen mit derzeitigen Testmethoden nicht erfassen.
3. Die von vielen Autoren (s. unten) beschriebene Reduktion bzw. sogar Aufhebung der Immunantwort bei Krebspatienten ist

auf fortgeschrittene Stadien der Erkrankung beschränkt. 4. Die die "immune surveillance"-Theorie stützenden Ergebnisse wurden tierexperimentell an Hand von chemisch oder Virus-induzierten Tumoren gewonnen, die erwiesenermaßen ausgeprägte TATA an ihrer Zelloberfläche tragen. Spontantumoren jedoch besitzen nur einen schwachen antigenen Charakter, und bei sehr vielen spontanen Tiertumoren ist ein Nachweis von TATA noch nicht gelungen.
Nun schließt eine nicht erfaßbare Abstoßungsreaktion eine immunologische Tumor-Wirt-Beziehung nicht aus, denn dies kann einerseits an technischen Schwierigkeiten liegen, andererseits gibt es viele Mechanismen, durch die TATA einer Abwehr des Immunsystems entgehen können (4). Sie legt jedoch im Zusammenhang mit obigen Beobachtungen nahe, daß eine Tumorabwehr erst spät und nur ineffektiv einsetzt. Insofern bleibt zweifelhaft, ob eine für die immunogenen Tiertumoren relevante Hypothese in vollem Umfang auf Human- (Spontan-) Tumoren übertragbar ist.

2.2.1 TUMOR - ASSOZIIERTE ANTIGENE

Überblick

Tumorzellen besitzen eine Reihe von Oberflächenantigenen unterschiedlicher Struktur, antigener Spezifität, Lokalisation und Mobilität, die z.T. für die bereits erwähnten Abstoßungsreaktionen sowie "tumor-escape"-Phänomene verantwortlich sind und an Hand ihrer biologischen Eigenschaften grob in TATA, TAA und VEA eingeteilt werden können (150).

Tumor-spezifische Transplantationsantigene (TSTA) oder genauer Tumor-assoziierte Transplantationsantigene (TATA) sind spezifisch für den malignen Zustand einer Zelle, existieren also nicht auf Normalzellen. TATA werden sie genannt, weil sie zu Abwehrreaktionen führen, die nach denselben Gesetzmäßigkeiten ablaufen wie die Transplantat-Abstoßungsreaktionen. Sie entstehen entweder durch Neubildung (= Neoantigene) oder durch Verlust von Zellmaterial (= Deletion) und sind in der Regel tumor- und individualspezifisch. Eine Ausnahme bilden Virus-induzierte Tumoren: hier können die entarteten Zellen verschiedener Tumorträger neben individualspezifischen TATA auch identische TATA tragen, wenn der Tumor durch dasselbe Virus verursacht wurde.

Die Tumor-assoziierten Antigene im engeren Sinn (TAA) unterscheiden sich funktionell von den TATA insofern, als TAA definitionsgemäß keine Transplantationsantigene darstellen und somit auch keine immunologische Tumorabstoßung provozieren. Darüberhinaus sind sie nicht notwendigerweise spezifisch für den entarteten Zustand einer Zelle, d.h. sie werden ebenso auf Normalzellen z.B. zu bestimmten, z.T. phasenspezifischen Embryonalstadien oder auch bei Infektion mittels eines onkogenen Virus, das zu keiner erfolgreichen Transformation führte, gefunden. In diese Gruppe gehören vor allem die kreuzreagierenden Neoantigene, die jeweils für Tumoren eines bestimmten histologischen Typs, nicht jedoch für das Individuum charakteristisch sind, sowie die ebenfalls kreuzreagierenden Differenzierungsantigene und die im Serum nachweisbaren onkofetalen Antigene,

deren bekannteste Vertreter das CEA (karzinoembryonales Antigen) und AFP ($Alpha_1$-Fetoprotein) sind. Bei letzteren z.B. handelt es sich nicht um Neoantigene, da sie nicht nur bei einer Reihe von malignen Prozessen, sondern auch bei einigen nicht-neoplastischen Erkrankungen sowie in geringen Konzentrationen sogar im Gesunden vorkommen (s. unten).
Virusstrukturproteine, sog. VEA (virally associated envelope antigens), existieren neben den bereits erwähnten TATA auf durch onkogene RNA-Viren transformierten Zellen, treten jedoch ebenfalls auf mit diesen Viren lytisch infizierten Normalzellen auf (10, 122).
Diese Antigene werden in vivo und in vitro spontan von Tumorzellen abgespalten ("shedding") und können dann im Blut zirkulierend als "blocking" oder "inhibitory factors" fungieren (s. später). Entscheidenden Einfluß hierauf sowie auf die Extrahierbarkeit solcher Antigene hat der Verankerungstyp in der Zellmambran, deren biologische Grundstruktur man sich deswegen kurz vor Augen halten muß: das Basisgerüst, eine Doppelschicht polarer Lipidmoleküle, steht in unterschiedlich fester Verbindung mit einer Matrix von Proteinen bzw. Glykoproteinen, die die äußere und innere Oberfläche bilden und im wesentlichen aus zwei Komponenten zusammengesetzt sind (fluid mosaic model; 149, 198): 1. Den sog. "integral membrane proteins (glycoproteins)", die in die Lipiddoppelschicht eingebettet sind und diese in ihrer ganzen Dicke penetrieren können. Sie besitzen die Fähigkeit zur horizontalen (lateralen) Diffusion (Mobilität in der Ebene des Phospholipidfilms), die durch eine Reihe von Mechanismen wie z.B. Fixierung an Zytoskelettelementen (Mikrotubuli, Mikrofilamente) in wechselnd starkem Ausmaß eingeschränkt wird. Eine vertikale Mobilität besteht jedoch wegen ihrer ausgeprägten Wechselwirkung mit den hydrophoben Bestandteilen der Membran praktisch nicht, weshalb sie auch ohne deren vollständige Desintegration kaum intakt zu extrahieren sind. 2. Den sog. "peripheral membrane proteins (compounds)", die nur schwach an die Membranoberfläche gebunden sind (vorwiegend an "integral membrane proteins") und durch Veränderung der Ionenkonzentration oder Verwendung von Chelat-bildenden Substanzen leicht abgespalten werden.

Die Eigenschaft, im Falle der Antigenität zytotoxische Immunreaktionen zu provozieren, ist im wesentlichen auf "integral membrane proteins" beschränkt, obwohl sich eine Zelle auch dann noch ihrem Schicksal entziehen kann (z.B. durch Freisetzung oder Endozytose von Membranfragmenten, die die betreffenden integral proteins enthalten). Da "peripheral membrane proteins" nach Bindung des korrespondierenden Antikörpers in der Regel abdissoziieren, bleibt hier die Zellyse meist aus.

2.2.1.1 Tumor-assoziierte Antigene im Humansystem

Der Großteil der Erkenntnisse über tumorimmunologische Prozesse wurde an Hand von experimentell induzierten Tumoren in Inzuchttieren gewonnen. Obwohl sich nun solche Systeme generell dazu eignen, als Modell für Humanneoplasmen zu dienen, müssen doch gravierende Differenzen berücksichtigt werden: experimentell (chemisch, physikalisch, viral) induzierte Tumoren wachsen in der Regel schnell, metastasieren selten und besitzen eine ausgeprägte antigene Oberflächenstruktur. Im Gegensatz hierzu wachsen Spontantumoren (und die meisten Humanmalignome entstehen wahrscheinlich spontan) langsam, metastasieren und sind nur schwach immunogen. Sie haben sich bisher als problematisch in Bezug auf Tumorantigene erwiesen, und bei sehr vielen Spontanneoplasmen ist der Nachweis einer Tumorimmunität bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gelungen. Als entscheidender Grund hierfür wird ein ausgesprochenes Defizit dieser Malignome an TATA angesehen. Während z.B. bei der Ratte fast alle karzinogeninduzierten Tumoren TATA tragen, konnten nur auf 30% aller spontanen Mammakarzinom- und 60% aller spontanen Sarkom-Zellen solche Antigene festgestellt werden; und selbst dann war das Ausmaß der durch sie ausgelösten Immunantwort erheblich geringer: Tiere, die mit induzierten Sarkomen immunisiert worden waren, vermochten eine subkutane Dosis von $1 - 5 \times 10^6$ der entsprechenden Zellen abzustoßen; im Falle des spontanen Mammakarzinoms jedoch schützte Präimmunisierung nur gegen eine Subkutandosis von maximal 2×10^4 Zellen (31).
Im Humansystem wird die Suche nach Tumorantigenen noch dadurch erschwert, daß man Hinweise auf die Existenz von TATA (z.B.

malignes Melanom) sowie histologisch kreuzreagierenden TAA nur über den Umweg der Immunantwort gegenüber autochthonem Malignomgewebe und deren Analyse bekommen kann. Hierzu wurden eine Reihe von Mithoden entwickelt, die später (Abschnitt 2.2.2) noch ausführlicher dargestellt werden, deren in-vivo Relevanz jedoch bis heute auf Grund des Fehlens ausreichender Informationen größtenteils Spekulation bleibt (31, 150).
Im Folgenden soll nun auf heute bekannte humane TAA eingegangen werden, die man grob in drei Kategorien einteilen kann: Histologisch kreuzreagierende Antigene, Virus-assoziierte Antigene und onkofetale Antigene.

Histologisch kreuzreagierende Antigene

Die Existenz solcher Antigene wurde ursprünglich an Hand der Resultate von Zytotoxizitätsexperimenten postuliert. Auch wenn die Aussagekraft dieser Testsysteme durch Publikationen über die spontane Zytotoxizität von sog. "natural killer cells" relativiert wurde, sprechen genügend Ergebnisse, die unter Anwendung unterschiedlicher Versuchsmethoden erzielt wurden, für das Auftreten von histologisch kreuzreagierenden TAA auf humanen Tumorzellen (z.B. Colon-, Bronchial-, Ovarial-, Mamma-Karzinom, uroepitheliale Tumoren, Neuroblastome, Melanome, Lymphome etc.) (31).

Virus-assoziierte Antigene

Einigen Viren wird eine ursächliche Rolle in der Genese von Humanneoplasmen zugeschrieben, nämlich dem EPSTEIN-BARR-Virus (BURKITT-Lymphom, Nasopharyngealkarzinom), dem Herpes-simplex-Virus Typ 2 (Karzinom der Cervix uteri) und den C-Typ-Viren (Leukämien). Diese Hypothese wird durch Beobachtungen gestützt, denen zufolge Virus-assoziierte Antigene auf den entsprechenden Tumorzellen vorkommen. So konnte man gleich mehrere Antigene mit dem BURKITT-Lymphom in Verbindung setzen: drei Virus-determinierte intrazelluläre Antigene (das in allen infizierten Zellen gefundene "nuclear antigen", das "early antigen" und das "viral capsid antigen") sowie zwei Membranantigene (das "membrane antigen" und das "lymphocyte-defined membrane antigen";

bei letzterem scheint es sich um ein TATA zu handeln). Auch auf Nasopharyngealkarzinom-Zellen treten einige EPSTEIN-BARR-Virus-assoziierte Antigene auf, z.B. das "viral capsid antigen", das "early antigen" und die beiden Membranantigene. Desweiteren konnte in diesen Zellen Virus-DNA identifiziert werden.

Onkofetale Antigene

Die onkofetalen Antigene werden im Verlauf der intrauterinen Entwicklung von Mensch und Tier in der Placenta oder in fetalen Organen gebildet und sind nach Geburt nicht mehr bzw. nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar (3). Im weiteren Sinne zählen auch fetale Enzyme, die erst unter Tumorentwicklung wieder im gleichen Gewebe auftreten wie z.B. beim Hepatom Aldolasen, LDH, Hexokinasen und Pyruvatkinase zu den carcinofetalen Substanzen (192), ferner in Tumoren ektopisch gebildete Hormone (6). Die Bildung solcher Antigene wurde schon 1929 von HIRSZFELD (94) vermutet und geschieht wahrscheinlich als retrogenetische Expression (208) bzw. durch Deletion oder Derepression eines reprimierten Genoms (72). Onkofetale Antigene sind in zahlreichen Tiertumoren beschrieben worden (179) und haben auch beim Menschen zunehmend an Bedeutung gewonnen, da man sich durch ihre Kontrolle eine Frühdiagnose bestimmter Tumoren, zumindest jedoch eine erfolgreichere Beurteilung therapeutischer Maßnahmen erhofft (123, 124, 126, 139). Deswegen seien sie anschließend etwas genauer besprochen.

AFP (Übersicht bei 123): Alpha-Fetoprotein (AFP), 1956 von BERGSTRAND und CZAR (17) sowie anderen (62, 80) entdeckt, ist ein $Alpha_1$-Glykoproteid mit einem Molekulargewicht um 65 000 d, das bei den meisten Säugetieren und beim Menschen schon früh während der Gestation im Feten auftritt und etwa vier Wochen nach Geburt im Neugeborenen wie später beim gesunden Erwachsenen nicht mehr oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar ist. Es wird im Dottersack, der fetalen Leber und dem fetalen Gastrointestinaltrakt gebildet und erreicht das Konzentrationsmaximum zwischen der 10. und 20. Schwangerschaftswoche. Im Fetalleben scheint es die erst anlaufende Albuminbildung zu ersetzen. Die nachgewiesene Östrogenbindung durch AFP wurde als mögliche

Schutzfunktion für den Feten gegenüber den mütterlichen Östrogenen gedeutet.
Die klinische Bedeutung von AFP, dessen Bildung sich im Tierversuch durch akute Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff sowie durch Verabreichung einer Vielzahl von chemischen, z.T. kanzerogenen Substanzen induzieren läßt, beruht auf seiner regelmäßig vermehrten Produktion beim primären Leberzellkarzinom, weniger häufig bei teratogenetischen Geschwülsten. Dort dient es vornehmlich zur Therapie- und Verlaufskontrolle. Seltene, geringere und mehr vorübergehende Erhöhungen des AFP-Spiegels fanden sich bei einigen anderen Primärtumoren mit sekundärer Leberbeteiligung und bei entzündlichen gastrointestinalen Erkrankungen vor allem der Leber (Hepatitis, Zirrhose). Neuere Untersuchungen weisen auch auf eine wachsende Bedeutung dieses Proteins für die Gynäkologie hin (erhöhte Spiegel bei Neuralrohrdefekten und fetal distress-Syndrom; Erhärtung der Differentialdiagnose Blasenmole/Chorionkarzinom bei der Kombination nicht erhöhter AFP-Spiegel nach 12. SSW bei positivem HCG und vergrößertem Uterus).
Immunologisch und biochemisch scheinen Fetal- wie Tumor-AFP identisch zu sein, ebenso Gewebs-AFP mit dem aus biologischen Flüssigkeiten. Beobachtete Differenzen sind hauptsächlich durch unterschiedlichen Sialinsäuregehalt bedingt. Desweiteren besteht zwischen den Alpha-Fetoproteinen verschiedener Spezies größtenteils antigenetische Verwandtschaft.
Von den Nachweisverfahren für AFP eignet sich der Radioimmunoassay wegen seiner hohen Empfindlichkeit (0,25 - 2,5 ng/ml) besonders gut zu Screening- und Verlaufsuntersuchungen und erlaubt auch die Bestimmung von Serumnormalspiegeln bei Erwachsenen ($<$ 20 ng/ml). Bei gesunden Schwangeren liegen die Serumkonzentrationen bis 550 ng/ml (III. Trimenon), bei Hepatitiden, Leberzirrhosen und anderen Lebererkrankungen meist unter 3 µg/ml, während beim primären Leberzellkarzinom Erhöhungen bis zu 6 mg/ml gefunden werden.

CEA (Übersicht bei 124): Das carcinoembryonale Antigen (CEA), 1965 von GOLD und FREEDMAN (66, 67) in Adenokarzinomen des Kolons als tumor- und organspezifisches Antigen beschrieben, ist

ein Beta$_1$-Glykoproteid mit einem Molekulargewicht um 200 000 d, das im Embryonalleben vorwiegend im Gastrointestinaltrakt und Pankreas als Zelloberflächen-Antigen gefunden und auch in Körperflüssigkeiten sezerniert wird. Aktivitäten dieses Proteins bzw. CEA-ähnlicher Substanzen konnten in Perchlorsäure-Extrakten zahlreicher maligner Neoplasien einschließlich ihrer Metastasen (höchste Konzentrationswerte bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber und Lunge; niedrigere bei Uterus-, Ovarial-, Nieren- und Nebennierentumoren), in wesentlich geringerem Ausmaß allerdings auch in nicht malignen Gewebeextrakten (zirrhotisch veränderte Leber; ferner Kolon, Magen, Pankreas, Lunge, Niere, Ovar, Uterus, Herz und Milz) nachgewiesen werden (101). Somit sind die Unterschiede im CEA-Gehalt von Tumor- bzw. Normalgewebe eher quantitativer als qualitativer Art, und die klinische Relevanz dieses Antigens liegt denn auch vor allem in seiner vermehrten Bildung mit signifikant erhöhten Plasmaspiegel bis über 20 ng/ml bei primären und sekundären Adenokarzinomen des Kolons und Rectums (Positivitätsrate 71%) sowie beim Pankreaskarzinom (80%). Andere gastro- und extragastrointestinale Malignome rufen ebenso wie nichtmaligne Erkrankungen vorwiegend des Gastrointestinaltraktes in der Regel seltenere und geringere CEA-Spiegelerhöhungen hervor: Magen-Ca. (45%), Oesophagus-Ca. (12,5%), Hepatom (69%), Lungen-Ca. (74%), Mamma-Ca. (54%), Prostata-Ca. (34%), Blasen-Ca. (28%), Cervix/Corpus-Ca. des Uterus (43%), Ovarial-Ca. (31%), Kopf/Nacken-Ca. (60%), malignes Melanom (50%) und Leukämien (35%); Hepatitis (17%), Leberzirrhose (61%), Pankreatitis (43%), Colitis ulcerosa (18%), M. Crohn (27%) und Divertikulitis (23%). Leicht erhöhte Konzentrationen kommen sogar bei gesunden Rauchern (19% gegenüber 3% bei Nichtrauchern) vor (124).

Reinigung und Nachweis von CEA werden insbesondere durch vielfältige Kreuzreaktionen des komplexen Moleküls mit anderen Substanzen wie z.B. Blutgruppensubstanzen (vor allem A, aber auch B, Le^a, Le^b) und weiteren Antigenen wie NCA (Nonspecific cross-reacting antigen, identisch mit NGP = Normal glycoprotein, CEX = = CEA-associated protein und CCA-III = Colonic carcinoma antigen III), FSA (Fetal sulfoglycoprotein antigen), CCEA-2 (Colonic carcinoembryonic antigen 2), BCGP (Breast cancer glycopro-

tein), $Beta_E$ (Beta external protein), NCA-2 (Second nonspecific crossreacting antigen), BGP II (Biliary glycoprotein II) und Gastric CEA-like antigen erschwert.
Wegen der vor allem im Normalserum bzw. -plasma sehr niedrigen CEA-Konzentration eignet sich zu seiner Bestimmung neben den üblichen Immunodiffusionsmethoden und dem Hämagglutinations-Hemm-Test (Empfindlichkeit 2 - 5 ng/ml) hauptsächlich der Radioimmunoassay, der heute im wesentlichen in drei Verfahren angewandt wird: indirekte CEA-Bestimmung aus EDTA-Plasma nach Vorextraktion mit Perchlorsäure durch Abtrennung des antikörpergebundenen CEA durch Z- (Zirconyl-) Gel-Bindung (Normgrenze 2,5 ng/ml, Fa. HOFFMANN-LA ROCHE), direkte Serum/Plasma-Bestimmung durch den Doppelantikörper-Test mit Präzipitation des antikörpergebundenen CEA durch einen zweiten Anti-Immunglobulin-Antikörper (Normgrenze 10 ng/ml, ISOTOPENDIENST WEST) und der Feste-Phase-Test mit Polystyrolkugeln und zwei Anti-CEA-Antikörpern nach Hitzefällung von Serum bzw. Plasma (Normgrenze 3 ng/ml, Fa. ABBOT).
Auf Grund der geringen Spezifität und Sensibilität (z.B. findet man bei nahezu der Hälfte aller Kolonkarzinomträger normale bis geringfügig erhöhte CEA-Spiegel) stellt die CEA-Bestimmung allein keine Methode zur Frühdiagnose der oben genannten Malignome dar. Zwischen Plasmakonzentration und Tumorgröße sowie -ausbreitung besteht jedoch eine gewisse Korrelation: Postoperativer Abfall spricht für die Vollständigkeit einer Tumorentfernung, CEA-Spiegelpersistenz bzw. Wiederanstieg für Metastasierung bzw. Rezidiv. Diese Beziehung läßt sich für eine Kontrolle des Therapie- und Krankheitsverlaufes bei bekannten und behandelten gastrointestinalen Tumoren ausnützen, und hierin liegt die wesentliche Bedeutung der CEA-Bestimmung für den klischen Routinebetrieb.

Weitere Carcinofetale Antigene (Übersicht bei 125) haben bis heute mit Ausnahme der carcinoplacentalen alkalischen Phosphatase (REGAN-Isoenzym) (57, 58), die sich u. a. bei Bronchial-, Mamma-, Urogenital- und Gastrointestinalkarzinomen im Serum nachweisen läßt, keine vergleichbare klinische Bedeutung erlangt. Im folgenden seien die wichtigsten kurz aufgeführt.
Das Alpha-2-H-Protein (= ein Isoferritin) wird in der Leber ge-

bildet und tritt im Serum bei einer Reihe von Tumoren (Hepatom, Cholangio-Karzinom, Lymphom, Nephroblastom, Neuroblastom, Teratom, Myelom etc.) vermehrt auf. Das fetale Sulphoglykoprotein-Antigen (FSA) findet sich in den Zellen der fetalen Gastrointestinalschleimhaut sowie im Magensaft von Magenkarzinomkranken. In fetalen Pankreasextrakten wurde ein onkofetales Pankreas-Antigen (POA) entdeckt und näher charakterisiert (63), das in erhöhten Konzentrationen fast nur im Serum von Graviden (Schwangerschaftsmitte) und von Pankreaskarzinom-Patienten vorkommt. Weiterhin erwähnenswert sind das wahrscheinlich mit dem C-reaktiven Protein identische Beta-S-Fetoprotein, das Gamma-Fetoprotein und das carcinofetale Glia-Antigen (CFGA) aus Gliablastomen und Astrocytomen.
Auch die ektope Plazenta-Hormonbildung wurde als Mechanismus für eine fetale Antigenproduktion bzw. als spezifischer Tumormarker (humanes Plazenta-Lactogen bei Bronchialtumoren, Hepatomen und Hepatoblastomen; ektope HCG-Bildung in Karzinomen von Magen, Leber, Pankreas, Mamma, Lunge und Kolon, ferner in Myelomen, Hepatoblastomen, malignen Melanomen) beschrieben (211).

2.2.2 TUMORIMMUNOLOGISCHE PROZESSE BEI PATIENTEN MIT NIERENKARZINOM

Nachweis tumorimmunologischer Prozesse

Ziel immunologischer Untersuchungen muß es sein, Tumorantigene nachzuweisen und die Entwicklung von Immunreaktionen gegen diese Antigene auf der Basis sowohl zellulärer als auch humoraler Mechanismen zu verfolgen. Hierzu kommen heute nachstehend aufgeführte Methoden in Frage (85):

1. in vivo
   a) Aktive Immunisierung gegen Tumorantigene
   b) Indirekter Nachweis der Immunität durch passive Immunisierung mittels Immunseren oder Immunzellen
   c) Kutanreaktionen im Sinne einer Delayed Type Hypersensitivity Reaction mit Tumorantigenen

2. in vitro
   a) humoral
      Nachweis zirkulierender Antikörper gegen Tumorantigene:
      - Immunpräzipitationstest
      - Komplementfixationstest
      - Immunfluoreszenztest
      - Radioimmunoassay
      - Mixed Hämagglutinationstest
      - Zytotoxizitätstests zum Nachweis zytotoxischer Antikörper
      - Zytoadhärenz
   b) zellulär
      - Zytotoxizitätstests
        Isotope Release Assay
        Farbstoffexklusionstest
        Mikrozytotoxizitätstest nach TAKASUGI und KLEIN
      - Mixed Lymphocyte Tumor Cell Culture
      - Nachweis von Lymphokinen
        Makrophagen-Migrations-Hemmtest (MMI)
        Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI)

Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test (MEM)
Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EMT)

Auch wenn immunologische Methoden zur Aufdeckung von Tumor-Wirt-Beziehungen wegen ihrer hohen Spezifität, d.h. der Fähigkeit, Antigene auf Grund geringster Unterschiede voneinander zu differenzieren, sowie ihrer hohen Empfindlichkeit (einige Antigene können heute im Nanogramm-Bereich bestimmt werden, z.B. AFP und CEA) eine potentielle Bedeutung für die Diagnose und Prognose von Krebs haben, so eignen sich doch nur wenige der oben erwähnten Testsysteme für klinische Fragestellungen. Denn obwohl für zahlreiche menschliche Tumoren TAA nachgewiesen worden sind, scheitert eine routinemäßige Anwendung meistens noch an ihrer zu aufwendigen und schwierigen technischen Handhabung. Somit kommen heute für klinische Routinebestimmungen nur Serumuntersuchungen zur Erkennung und prognostischen Beurteilung von Malignomen in Frage. Die wichtigsten Methoden beziehen sich auf den Nachweis von AFP, CEA und das sogenannte REGAN-Isoenzym der alkalischen Phosphatase.
Wegen der überwiegenden Bedeutung zellulärer Immunreaktionen für die Abstoßung von Tumoren wäre ein Nachweis dieser Reaktionen besonders wichtig. Im folgenden Abschnitt sollen daher einige der am häufigsten praktizierten Testsysteme zur Bestimmung der Immunitätslage von Nierenkarzinom-Patienten ausführlicher behandelt werden.

Delayed Hypersensitivity (DTH)

Die Beurteilung der Hautreaktionen vom Spättyp (DTH) als in vivo-Modell für zellvermittelte Immunität gelingt durch intrakutane Injektion von sogenannten "recall antigens" (PPD = purified protein derivative = Tuberculin , Streptokinase-Streptodornase, Candida albicans etc.) sowie von niedrigmolekularen Haptenen (DNCB = Dinitrochlorbenzol, Picrylchlorid, Paraazobenzol). Die Interpretation von Testergebnissen bei Verwendung von "recall antigens" ist nicht leicht, weil eine "Immunschwäche" bzw. Anergie nur dann diagnostiziert werden kann, wenn die Immunantwort nach vorheriger adäquater Exposition gegenüber dem Allergen supprimiert ist bzw. ausbleibt. Substan-

zen wie DNCB jedoch besitzen die Fähigkeit, unter Ausbildung stabiler Komplexe mit Hautproteinen als Haptene zu fungieren, und führen deshalb ca. zwei Wochen nach ihrer Erstapplikation zu einer DTH. Ihnen wird deswegen oft der Vorzug gegeben (33, 137).

An Patienten mit Nierenkarzinom konnten CATALONA et al. (33) eine deutlich herabgesetzte Reaktionsfähigkeit auf intrakutane Gaben von DNCB demonstrieren, die mit dem Schweregrad des Prozesses korrelierte und nicht auf Therapieauswirkungen (Operation, Bestrahlung) zurückzuführen war. Während sie in dem Kollektiv mit lokal begrenztem Karzinom bei 33% eine subnormale Immunantwort feststellten, fanden sie diese bei 60% der Patienten mit Fernmetastasen; 20% davon waren sogar anergisch. Andere Arbeitsgruppen (27, 137, 146) erhielten vergleichbare Ergebnisse nur für das metastasierende Nierenkarzinom; Personen mit lokalisiertem Geschehen reagierten in den Kutantesten unauffällig.

MORALES et al. (146) zeigten zusätzlich zu den genannten Veränderungen eine mit fortschreitender Erkrankung zunehmende T-Lymphopenie, die nach erfolgreicher Operation wieder fast normale Werte annahm.

Ob dieses anomale Verhalten jedoch kausal mit dem malignen Prozeß verknüpft ist oder nur eine sekundäre Manifestation desselben darstellt, bleibt offen.

Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI)

Sensitive, immunologisch kompetente Lymphozyten sind in der Lage, in vitro nach Inkubation mit spezifischem Antigen verschiedene chemische Mediatoren, sogenannte Lymphokine, freizusetzten, die als verantwortliche Faktoren für viele in vivo Phänomene zellulärer Immunreaktionen angesehen werden. Das erste Untersuchungssystem, an Hand dessen diese Mechanismen aufgeklärt wurden, war der Makrophagen-Migrations-Hemmtest (MMI). In seiner als Kapillarmethode modifizierten Form werden Meerschweinchen-Peritoneal-Makrophagen am Auswandern aus einer Glaskapillare durch eine lösliche Substanz, den Makrophagen-Migrations-Hemmfaktor (MIF, = Migration Inhibitory Fac-

tor) gehindert, den sensibilisierte Lymphozyten in Gegenwart des betreffenden Antigens an das Kulturmedium abgeben. Klinische Anwendungsmöglichkeiten für diese Untersuchungsmethode eröffneten sich dann mit der Einführung des Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI) durch BENDIXEN und SÖBURG (12), in dem Granulozyten als Indikatorzellen die wandernde Zellpopulation darstellen. Das gebildete Lymphokin, mit MIF physikochemisch nicht identisch, wurde LIF (Leucocyte Inhibitory Factor) genannt (182).

Mit Hilfe des LMCT (Leucocyte Migration Capillary Tube Technique, leicht modifizierte Form des LMI) konnten KJAER et al. in einer Reihe von Untersuchungen (104, 105, 106, 108, 109) bei ca. 50% der Träger eines Nierenkarzinoms zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine tumorspezifische zellvermittelte Hypersensitivität gegen ein kreuzreagierendes, möglicherweise onkofetales Antigen (III. Schwangerschaftstrimenon) demonstrieren, die sie durch Inkubation der Patientenleukozyten mit autologem und allogenem Karzinomextrakt sowie mit fetalem Nierengewebe etablierten. Dieser Effekt nahm mit dem Schweregrad der Erkrankung ab und war in weit fortgeschrittenen Stadien nicht mehr nachweisbar (105, 108, 109). Als Erklärung hierfür bieten sich nach Meinung der Autoren zwei Mechanismen an, über die Tumoren einer Abwehr durch das Immunsystem entgehen können (44):

- Sogenannte "inhibitory factors", d.h. zirkulierende Tumorantigen-Antikörper-Komplexe oder Tumorantigene allein, die die Leukozyten bedecken und somit deren Reaktivität herabsetzen. Die Existenz solcher Faktoren wurde in Tierexperimenten mehrfach abgesichert (Präinkubation sensitiver Lymphozyten mit löslichem Tumorantigen mindert deren zytotoxische Reaktivität gegenüber dem entsprechenden Tumor, die durch anschließendes Waschen der Zellen wiederhergestellt wird).
- Sogenannte "blocking factors", d.h. tumorspezifische Antigen-Antikörper-Komplexe in optimalem Konzentrationsverhältnis (Überschuß eines der beiden Partner bewirkt keine blokkierende Aktivität), die Tumor-Targetzellen "maskieren" und somit dem Zugriff sensibilisierter Lymphozyten entziehen. Auch diese Substanzen wurden in Tierversuchen wiederholt

nachgewiesen.
Evidenz für die Interaktion solcher Faktoren im LMCT erhielten die Autoren aus folgenden Beobachtungen: Intensives Waschen von Leukozyten nicht oder nur schwach reagierender Patienten konnte die Hypersensitivität gegenüber allogenem Tumorgewebe wiederherstellen bzw. erheblich steigern, während der Überstand aus den Waschungen die Reaktivität von Leukozyten minderte oder aufhob. Den gleichen Effekt erzielten sie durch Inkubation sensitiver Leukozyten mit dem Serum im LMCT negativer Patienten (107). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese der "antigenic inhibition" (44), d.h. bei dem abwaschbaren Faktor handelt es sich um lösliches Tumorantigen. Für die scheinbar bedeutend geringere Antigenität des Tumors von Patienten mit Fernmetastasen, die KJAER et al. im Vergleich mit kleinen lokalisierten Nierenkarzinomen in allogenen Kombinationen ermittelten, machten sie blockierende Substanzen verantwortlich (108, 109).

Diese Resultate wurden von PAPPAS et al. (165, 166) an erfolgreich operierten und bestrahlten Nierenkarzinom-Patienten in autologen und allogenen Testanordnungen bestätigt, jedoch mit einer wesentlich höheren Positivitätsrate (fast 90%). In einer weiteren Studie an nichtreaktiven Trägern eines metastasierenden Hypernephroms konnten SCHWARZE et al. (194) die Hypersensitivität durch in vitro-Bestrahlung der Tumorextrakte wiederherstellen, während dieses Vorgehen bei Extrakten von Normalnierengewebe die Wanderung der Leukozyten nicht beeinflußte (somit keine Antwort auf Histokompatibilitätsantigene des Extraktes, keine toxischen Effekte durch die Prozedur). Sie schlossen daraus auf eine wirkungsvollere Aufbereitung bzw. Demaskierung der Tumorantigene durch die Bestrahlung.

Die Methode ist im wesentlichen qualitativ. Während sie für die Demonstration von Immunreaktionen gegen Tumorantigene nützlich sein mag, hat sie für die Routinekontrolle individueller Karzinom-Patienten wenig Wert (31), vor allem in Anbetracht der technischen Schwierigkeiten, mit denen sie auch verbunden ist (184). So arbeiteten KJAER et al. bei der Extraktzugabe in einem sehr schmalen Dosisbereich, der in Vorexperimenten genau bestimmt werden mußte (106): höhere Antigenkonzentrationen be-

dingten eine unspezifische Hemmung im LMCT, niedrigere Konzentrationen zeigten keinen Unterschied zwischen gesunden und kranken Personen auf.

Lymphozytenaktivierung

Die Aktivierung oder Stimulierung von Lymphozyten als in vitro Korrelat eines in vivo Prozesses, der sich nach Wechselwirkung zwischen Antigen und sensibilisierten Lymphozyten abspielt, gelingt durch Zusatz von sowohl unspezifisch wirkenden Mitogenen wie Phythohämagglutinin (PHA) oder Concanavalin A als auch von spezifisch angreifendem Antigen in Form von frischen oder kultivierten Tumorzellen bzw. löslichen Tumorantigenen (MLTC = Mixed Lymphocyte Tumor Culture) zu Lymphozytenkulturen. Die Beurteilung des Lymphozytentransformationstestes geschieht durch Auszählen der zu Blasten transformierten Lymphozyten oder durch Messen der ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA als Ausdruck der Lymphoblastenbildung.
Unter Anwendung des MLTC fanden STJERNSWÄRD et al. (207) bei 50% und HEMSTREET et al. (90) mit der Testvariante nach BOYSE et OLD (26) (gereinigte Tumormembranen als stimulierendes Antigen) sogar bei 75% der untersuchten Hypernephrom-Patienten tumorspezifische Immunreaktionen gegen autologes Karzinomgewebe. Da in der letzteren Studie nur einer von sieben Patienten auf allogenes Karzinomgewebe reagierte, nahmen die Autoren den Nachweis eines nicht kreuzreagierenden Tumorantigens an.

Lymphozytäre Antworten im MLTC können durch eine Reihe von spezifischen und unspezifischen Substanzen im Humanserum supprimiert werden (31). McLAUGHLIN et al. (142) machten die Existenz eines solchen spezifischen "inhibitory factor" für die herabgesetzte Stimulierbarkeit der Lymphozyten von Nierenkarzinom-Patienten mittels PHA verantwortlich. Sie schien ihnen wahrscheinlicher zu sein als eine durch abnormes Verhalten der Lymphozyten ausgelöste Minderung der zellulären Immunität.

Zytotoxizitätstests

Von mehreren in vitro-Techniken zur Erfassung zellvermittelter Zytotoxizität gegen Tumor-Target-Zellen haben sich im wesent-

lichen der Isotope-Release-Assay und der Microcytotoxicity-Assay nach TAKASUGI und KLEIN (212) durchgesetzt. Der ^{51}Cr-Release-Assay mißt die Menge radioaktiven Isotops, die nach Schädigung von ^{51}Cr ($^{51}Cr_3O_4^-$)-markierten Tumorzellen durch sensibilisierte zytotoxische Lymphozyten in den Überstand freigesetzt wird. Im Microcytotoxicity-Assay wird die Anzahl überlebender Target-Zellen nach Zusatz der zu testenden Lymphozyten bestimmt.

Eine Reihe von Studien berichten über tumorspezifische Zytotoxizität der Lymphozyten von Malignomkranken gegen autologe und allogene Target-Zellen (88, 89, 120, 156, 157) sowie etablierte Tumorzellinien der entsprechenden Herkunft (79, 156, 157, 158). Darüberhinaus zeigten O'TOOLE et al. (156, 157) an Patienten mit Blasenkarzinom eine signifikante Stadienabhängigkeit der Immunreaktivität, die mit fortschreitendem Prozeß kontinuierlich abnahm und gewisse prognostische Aussagen erlaubte: eine erfolgreiche Behandlung (Operation, Bestrahlung) war meist mit dem Wiedererlangen der tumorspezifischen Zytotoxizität verbunden, die dann erst innerhalb etwa einen Jahres langsam verschwand und somit das Fehlen des ständigen Antigenreizes durch noch vorhandene lebende Tumorzellen andeutete.

Unterschiedliche Resultate werden bei der Anwendung dieses Untersuchungssystems auf Nierenkarzinomkranke berichtet. Obwohl die meisten Autoren zytotoxische Reaktionen gegen autochthone und allogene Tumorzellen demonstrieren konnten (19, 35, 42, 51), bestätigten doch nur wenige die von O'TOOLE (156, 157) beschriebene Stadienabhängigkeit (19, 42). Ebenso hatte die Tumorentfernung nach BICHLER et al. (19) keinen Einfluß auf das Testergebnis, was im Widerspruch zu anderen Studien steht (35, 145). Für die letztere Arbeitsgruppe (MONTIE et al., 145) z.B. war der postoperative Anstieg der zellvermittelten Zytotoxizität die einzige Korrelation zwischen klinischem Krankheitsbild und Immunitätslage, die sie fand. Darüberhinaus waren bei vielen gesunden Individuen sowie bei anderen Malignomkranken (malignes Melanom, Sarkome) signifikante zytotoxische Reaktionen gegen Nierenkarzinom-Zellinien nachweisbar, die eine Unterscheidung dieser Kontrollgruppe von Hypernephrom-Patienten nicht mehr erlaubte und im Einklang mit weiteren Pub-

likationen steht (21, 79, 158, 213).
Aus den erwähnten, z.T. kontroversen Studien geht hervor, daß die Interpretation der mittels Zytotoxizitätstests erhaltenen Ergebnisse komplizierter ist, als man ursprünglich annahm, selbst wenn methodisch bedingte Verfälschungen (z.B. durch Granulozytenkontamination, Monozytenaktivität, Zellverklumpung und Instabilität der Inkubationsbedingungen, vor allem des pH) ausgenommen werden können. So ermöglicht z.B. die relativ lange Kulturzeit der Lymphozyten mit Tumorzellen eine sekundäre Stimulation von Effektorzellen. Desweiteren ist heute bekannt, daß die in vitro Schädigung von Targetzellen zumindest nicht nur auf einer spezifischen Aktivierung von immunkompetenten Zellen beruht. In diesem Zusammenhang sei auf die bedeutende Rolle der spontanen Zytotoxizität von sogenannten "natural killer cells" verwiesen, die vor allem in Veröffentlichungen jüngeren Datums betont wird (158, 162, 163, 164) und z.B. das Ergebnis von MONTIE et al. (145) erklären kann, sowie auf die Funktion von Suppressorzellen, die in diesen Experimenten nicht definiert ist (145).
Zusammengefaßt legen die dargestellten Untersuchungssysteme die Existenz einer gegenüber dem Normalgewebe abweichenden Antigenstruktur von Tumorzellen nahe, auch wenn die Spezifität der Immunantwort sowie die Beteiligung einzelner Lymphozytensubpopulationen an ihr nicht geklärt sind. Im Mittelpunkt des folgenden Abschnittes sollen nun die Versuche stehen, einige dieser Antigene an Hand von Nierenkarzinompräparationen näher zu charakterisieren.

2.2.3 EIGENSCHAFTEN VON TUMOR - ASSOZIIERTEN ANTIGENEN DES NIERENKARZINOMS : EXPERIMENTELLE DATEN

Eine Reihe von Autoren fand mit unterschiedlichen Testsystemen und z.T. stark divergierenden Häufigkeitsangaben (zwischen 13,5% und 94%) in den Seren von Hypernephromkranken Antikörper gegen Nierenkarzinom- (1, 45, 129) bzw. normales Nierengewebe (60) mit z.T. ausgeprägten Kreuzreaktionen (z.B. 60), wobei ungeklärt ist, welche antigenen Determinanten die Produktion dieser Immunglobuline induzierten. Da sie zwar oft ein hohes Maß an Sensitivität, jedoch nur geringe Spezifität aufweisen (Vorkommen auch bei verschiedenen malignen Erkrankungen anderer Organe, benignen Krankheitsbildern und Gesunden), besteht ihr Wert, wenn überhaupt, primär in der Möglichkeit, ihre Bestimmung als Kontrolle des Krankheits- und Therapieverlaufes einzusetzen (45, editorial comment).
Mit Hilfe des LMI demonstrierten WRIGHT et al. (229) bei über 60% ihrer Hypernephrom-Patienten eine zellvermittelte Hypersensitivität gegenüber einem 3 M KCL-Extrakt von Nierenkarzinomgewebe (keine Reaktion gegenüber normalem Nierengewebe), konnten jedoch die bereits früher erwähnten Ergebnisse anderer Autoren (s. S. 27 ff.) über die hohe Tumorspezifität der Reaktion nicht bestätigen: so war das Testergebnis auch bei 30% der Träger anderer Malignome, 36% der Patienten mit benignen Nierenerkrankungen und 7% der gesunden Kontrollpersonen positiv. Zur näheren Charakterisierung dieses antigenen Verhaltens unterwarfen sie den Extrakt einer präparativen Acrylamidgel-Gradient-Elektrophorese und erhielten nun zwei reaktive Fraktionen: eine im höheren Molekulargewichtsbereich, mit der Leukozyten der Hypernephrom-Patienten und Kontrollpersonen gleichermaßen reagierten (33% bzw. 40% bei allerdings nur drei bzw. fünf getesteten Personen), und eine im Molekulargewichtsbereich von Albumin, die nur mehr mit Leukozyten von Nierenkarzinom-Kranken (71% bei sieben geprüften Patienten), nicht aber von den anderen Kollektiven, ein positives Testresultat ergab. Hieraus schlossen sie auf die partielle Reinigung eines

Nierenkarzinom-assoziierten Tumorantigens mit einem Molekulargewicht von ca. 70 000 d.
Im Verlauf von Experimenten mit der Fragestellung, ob das Hepatitis-B-Antigen über die Plazenta auf den Embryo übertragen werden könne, stießen KISTLER und SONNABEND (103) auf ein sog. fetorenales Antigen (FRA) an der epithelialen Oberfläche der Niere und Harnwege (Sammelrohre, Calices, Nierenbecken, Ureteren, Harnblase) des menschlichen Fetus bzw. in Konzentraten von Fruchtwasser (Vorkommen auch in der Niere von Kaninchen-, Ratten- und Kälberfeten), das in den anderen fetalen Organen sowie in den Nieren von Säuglingen fehlte und offensichtlich eine oder mehrere antigene Determinanten mit dem Hepatitis-B-Antigen teilt: in der indirekten Immunfluoreszenz reagierten nämlich alle von ihnen untersuchten menschlichen und tierischen anti-HB-Ag-positiven (festgestellt mittels Immunpräzipitations-Elektrophorese) Seren mit diesem Antigen, eine Aktivität, die sich nach Absorption der Seren mit gereinigtem HB-Ag nicht mehr nachweisen ließ. Überraschenderweise fanden sie jedoch Antikörper gegen FRA auch in 21% der Seren von Adulten mit akuter Hepatitis B, 14% der Seren unausgewählter Blutspender und 100% der Seren von Patienten mit Nierenkarzinomen, die im Falle der Hepatitis anti-HB-Ag-negativ und ansonsten HB-Ag- und anti-HB-Ag-negativ waren, allerdings in der indirekten Fluoreszenz allesamt eine positive Reaktion mit den Kryostatschnitten von HB-Ag-positiven menschlichen Lebern zeigten. An Hand dieser Resultate entwickelten die Autoren nun folgende Hypothesen:

- Anti-HB-Ag ist mit anti-FRA entweder identisch oder immunologisch eng verwandt. Dies bedeutet, ein Infekt mit Hepatitis-B-Virus in der Postnatalperiode führt zur Derepression und de novo Synthese von FRA, das im Serum mit dem korrespondierenden Antikörper reagiert und somit die Entstehung des HB-Ag-Partikels (= Antigen-Antikörper-Komplex) induziert.
- da bei einer Hepatitis B die Leberzellen als Hauptbildungsort von HB-Ag gelten, müßte eine solche Synthese postnatal an ektopischer Stelle (d.h. in der Leber) erfolgen.
- Ursprungsort des Nierenkarzinom sind nicht die Tubuluszellen des proximalen Konvolutes (kein Nachweis von FRA an die-

ser Stelle), sondern das Urothel.
Diese Ergebnisse und Folgerungen vermochten andere Autoren nicht zu überzeugen. So konnten POPELIER und SION (177) in Nierenkarzinomextrakten mittels Radioimmunoassay kein Hepatitis-B-Antigen aufspüren. Desweiteren gelang weder ihnen noch BICHLER und SODOMANN (20) der radioimmunologische Nachweis von Antikörpern gegen HB-Ag im Serum von Hypernephrom-Patienten; solche hatten allerdings auch KISTLER und SONNABEND in den Seren ihres Nierenkarzinom-Kollektivs nicht finden können.

Zudem gelten nach heutiger Meinung die Tubuli des proximalen Konvolutes als Ausgangsort des Nierenkarzinoms. Im Kontext hiermit stehen auch Resultate von OZAWA et al. (161) über Antikörper gegen ein Nierenkarzinom-spezifisches, nicht individualspezifisches Tumorantigen in den Seren von Hypernephrom-Kranken, das eine oder mehrere antigene Determinanten mit RTE (renal proximal tubular epithelial antigen, Lipoprotein der Zellen des proximalen Konvolutes) und mit einem dem RTE immunologisch eng verwandten Lipoprotein der Jejunumschleimhaut teilt und dessen Existenz sie in Absorptionsversuchen mit den Patientenseren sowie mit xenogenen Immunseren (hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit Nierenkarzinomextrakt) etablierten. Zwischen der Bildung von Tumorantigen-Antikörper-Komplexen und der Pathogenese der mit dem Hypernephrom relativ häufig assoziierten Glomerulonephritis sahen sie einen Kausalzusammenhang.
GHOSE et al. (65) berichteten über xenogene Antiseren gegen ein kreuzreagierendes Nierenkarzinom-Antigen, die sie durch Immunisierung von Ziegen und Kaninchen mit Tumorzellen (Einzelzellsuspensionen) und -extrakten herstellten. Diese Antikörperpräparationen reagierten immunfluoreszenzoptisch nach Absorption mit humanen Erythrozyten und verschiedenen Gewebsextrakten (Leber, Milz, Lunge, Herz) noch mit den Tubuluszellen des proximalen Konvolutes von adulten und fetalen menschlichen Nieren sowie von Kaninchen-, Meerschweinchen-, Ratten- und Mäusenieren, nach weiterer Absorption mit gepoolten normalen Nierenextrakten jedoch ausschließlich mit 21 von 22 geprüften Nierenkarzinomproben sowie mit Oberflächenantigenen der fünf geteste-

ten Nierenkarzinomzellinien. Gleichwohl vermochten die Autoren diese tumorspezifische Reaktion in der OUCHTERLONY-Untersuchung nicht nachzuweisen, was sie auf einen zu geringen Antikörpertiter zurückführten. Darüberhinaus ließen Autoradiographieexperimente mit Gewebsschnitten von Karzinomnieren nur quantitative Unterschiede erkennen: die Tumorregion zeigte eine erhebliche Anreicherung der ^{131}J-markierten Antikörper gegenüber der angrenzenden Niere.
Hingegen publizierten TEICHMANN et al. (214) die erfolgreiche Präparation von Nierenkarzinom-spezifischen Antikörpern unter Anwendung der Immunosorbens-Technik, die sie mit dem Ziel einer in vivo Tumorlokalisation durch Immunisierung von Kaninchen mit Hypernephromextrakt und Absorption der so erhaltenen Antiseren mit Serumproteinen und normalem Nierengewebe erzielten. In einem Modellversuch injizierten sie der Patientin, deren Hypernephrom sie z.T. zur Immunisierung verwandt hatten, etwa 1 mg der ^{131}J-markierten Anti-Hypernephrom-Antikörper intravenös und konnten so den szintigraphischen Nachweis der zurückgelassenen Lymphknoten-Metastasen erbringen.

Nachdem die Analyse von tumorimmunologischen Prozessen zwar Indizien für eine tumorspezifische Antigenität als Eigenschaft von Tumorzellen erbrachte, aber keine weiterführende Definition dieser Antigene erlaubte, haben letztgenannte Autoren (65, 161, 214) versucht, über die Herstellung xenogener Antiseren gegen Hypernephromgewebe einer Charakterisierung und Isolierung von Nierenkarzinom-spezifischen oder -assoziierten Antigenen näher zu kommen. Diese Technik, die auch den Experimenten der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, wirft allerdings eine Reihe von Problemen auf wie z.B. die Schwierigkeit oder sogar Unmöglichkeit, vor allem bei Verwendung von gepoolten Gewebsextrakten wegen allogenetischer Differenzen zwischen den Spendern von Tumor- und Normalmaterial tumorspezifische Antigene von den normalen, individualspezifischen zu unterscheiden (68). Inwieweit solche Prozesse die Ergebnisse der oben erwähnten Gruppen (65, 214) zu relativieren vermögen, soll an anderer Stelle noch ausführlicher erläutert werden.

2.3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.3.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

2.3.1.1 ZUR METHODIK VERWANDTES MATERIAL

Tumor- (Normalgewebs-) Quelle

Zur Extraktion gelangten histologisch verifizierte, wenig nekrotische Adeno-Karzinome der Niere (renal cell carcinoma in der angloamerikanischen Literatur) von 10 Patienten, die alle intra operationem gewonnen wurden. Unmittelbar nach Nephrektomie wurde das Operationspräparat für den Transport in Eiswasser gegeben. Anschließend wurde der Tumor von dem angrenzenden Nierengewebe abgetrennt, nach grober Reinigung von nekrotischem Material in Plastikfolien eingeschweißt, beschriftet, gewogen und bei -70°C in einer KÖTTERMANN-Labortiefkühltruhe[1] bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.
Anfangs verwandten wir das Restgewebe bei Einhaltung eines Mindestabstandes von 2 cm zum Tumorrand (histologisch sicher tumorfreies Gewebe) nach Entfernung der Capsula fibrosa und des Fettgewebes ebenfalls zur Herstellung eines Extraktes (NNE 7/75). Später stand hierfür eine wegen Gefäßanomalien nicht transplantable Unfallniere zur Verfügung (NNE 3/76).

Antiseren

Sämtliche zum Aufbau der Methodik verwandten Antiseren wurden durch eigene Immunisierung von Kaninchen mit selbst hergestellten Tumorextrakten bzw. vorgereinigten Fraktionen erhalten. Als Referenz-Anti-Ferritin- und -Anti-Lactoferrin-Seren benutzten wir Chargen der Fa. BEHRINGWERKE[2].
Zur Überprüfung der einzelnen Reinigungsschritte des Tumorge-

---

1 Fa. KÖTTERMANN, Hämigsen, Hannover

2 Fa. BEHRINGWERKE, Marburg

websextraktes auf Verunreinigungen mit Serumproteinen wurden poly- und monovalente Antiseren der Fa. BEHRINGWERKE wie Anti-Human-, Anti-Albumin-, Anti-Alpha$_1$-Glykoproteid- (GP), Anti-Alpha$_1$-Antitrypsin- (AT), Anti-Haptoglobin- (HP), Anti-Alpha$_2$-Makroglobulin- (MG), Anti-Coeruloplasmin- (Coer.), Anti-Transferrin- (Trans.), Anti-Beta$_{1A}$-Globulin- (B_{1A}), Anti-IgG-, Anti-IgA- und Anti-IgM-Seren verwandt.
Die Bestimmung von CEA und AFP in den Patientenseren sowie den Gewebsextrakten erfolgte mittels in diesem Arbeitslabor entwikkelter (126) Radioimmunoassays aus eigener Produktion (eigene Markierung, s. später), für die Untersuchung der Patientenseren auf Ferritin wurde ein Radioimmunoassay der Fa. BEHRINGWERKE AG (RIA-gnost Ferritin) herangezogen.

2.3.1.2 UNTERSUCHTES PATIENTENGUT

2.3.1.2.1 CEA

Normalkollektiv

Zur Ermittlung von normalen CEA-Werten dienten die Serumproben von 60 gesunden Bundeswehr-Rekruten im Alter zwischen 18 und 23 Jahren, bei denen anläßlich der Einstellungsuntersuchung keine pathologischen klinischen oder klinisch-chemischen Befunde erhoben werden konnten.

Patientenkollektiv

Die Seren von 107 Patienten mit einem gesicherten Nierenkarzinom wurden mittels eines Radioimmunoassays auf CEA untersucht. Bei einer Geschlechtsverteilung männlich : weiblich von 74 : 33 lag das Alter der Kranken zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 21 und 76 Jahren, 73 (68,2%) waren älter als 50 Jahre. In 90 der 107 Fälle war das Stadium der Tumorerkrankung an Hand des Operationsbefundes bzw. durch klinische Untersuchungen (Röntgen, Szintigraphie, Computertomographie, klinisch-chemisch) beurteilbar. Hiervon konnte bei 50 Kranken die Bestimmung kurz nach Stellung der Diagnose durchgeführt werden: 25 Studien erfolgten prä- und postoperativ, 8 nur prä- und

Tabelle 2

STADIUM DER TUMORERKRANKUNG VON PATIENTEN, DEREN SEREN ZUM ZEITPUNKT DER ERSTDIAGNOSE AUF CEA, AFP UND FERRITIN UNTERSUCHT WURDEN.

	T_1	T_{2-3}				T_4
	N_0M_0	N_0M_0	N_0M_1	$N_{1-4}M_0$	$N_{1-4}M_1$	$N_{1-4}M_{1/X}$
Patienzahl:						
CEA	5	25	4	5	2	9
AFP	5	23	6	4	2	10
Ferritin	3	19	2	1		4

8 nur postoperativ. 9 Kranke dieser Gruppe waren bereits inoperabel. Eine Aufschlüsselung des Metastasierungsgrades nach den Regeln der UICC ist in Tabelle 2 wiedergegeben.
Bei den anderen 40 Patienten lag die Nephrektomie wegen eines Nierenkarzinoms bereits mindestens sechs Monate, bei den meisten jedoch über ein Jahr bis zu 17 Jahren (1 Fall) zurück. 19 Personen dieses Kollektivs mußten auf Grund einer Progredienz ihres Leidens (Rezidiv, Metastasen) behandelt werden, 21 waren bis zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei ohne Hinweis auf ein Rezidiv oder Metastasen.

2.3.1.2.2 AFP

Normalkollektiv

Das Normalkollektiv bestand aus 100 Bundeswehr-Rekruten im Alter von 17 bis 20 Jahren sowie aus 40 Probanden im Alter von 20 bis 30 Jahren (weiblich : männlich = 20 : 20), bei denen keine normabweichenden Untersuchungsbefunde zu ermitteln waren.

Patientenkollektiv

Die AFP-Konzentration wurde in den Seren von 106 Nierenkarzinom-Kranken (Geschlechtsverteilung männlich : weiblich = 74 : 32) mit einem Alter zwischen 21 und 76 Jahren, von denen 72 (70,8%) älter als 50 Jahre waren, bestimmt.
Von insgesamt 89 klinisch klassifizierbaren Tumorerkrankungen

wurden 50 Patienten kurz nach Diagnosestellung untersucht (25 prä- und postoperativ, 7 nur prä- und 9 nur postoperativ, 9 inoperabel; Metastasierungsgrad s. Tabelle 2), 39 standen wegen eines operierten Hypernephroms (Nephrektomie mindestens sechs Monate zurückliegend) unter regelmäßiger Kontrolle, wobei 19 an einem Rezidiv litten und 20 symptomfrei waren.

2.3.1.2.3 Ferritin

Ferritinbestimmungen wurden in den Seren von 54 Hypernephrom-Patienten (Geschlechtsverteilung männlich : weiblich = 35 : 19) mit einem Alter zwischen 25 und 76 Jahren, von denen 38 älter als 50 Jahre waren, durchgeführt. 29 dieser Kranken konnten kurz nach Stellung der Diagnose untersucht werden (16 prä- und postoperativ, 10 nur präoperativ; 3 inoperabel; Stadieneinteilung s. Tabelle 2), 25 standen auf Grund eines operierten Nierenkarzinoms unter regelmäßiger Kontrolle, wovon 13 eine therapiebedürftige Progredienz ihres Leidens aufwiesen.

2.3.2 METHODIK

2.3.2.1 ANALYTISCHE VERFAHREN

Gesamt-Eiweiß

Die Gesamt-Eiweiß-Bestimmung wurde nach der Biuret-Methode von WEICHSELBAUM (223) als Mikro-Verfahren (0,02 ml eiweißhaltiges Material, 1,0 ml Biuret-Reagenz[1]) durchgeführt und bei 547 nm im Spektral-Photometer[2] gemessen.

CAF-Elektrophorese

Die elektrophoretische Analyse erfolgte nach der Methode von GRASSMANN und HANNIG (74, 83) in der von KOHN (115, 116, 117) modifizierten Anwendungsform in einer Mikrophor-Kammer[3] auf Cellulose-Acetat-Folien als Trägermedium (25,5 x 145 mm)[4] bei einer Spannung von 250 V und einer Stromstärke von 10 mA/cm sowie einer Laufzeit von 60 Minuten. Anschließend wurden die Folien mit Amidoschwarz 10 B gefärbt und mit einem Extinktions-Integralschreiber (E 3)[5] ausgewertet.

Immunelektrophorese

Die immunelektrophoretische Untersuchung wurde nach dem Verfahren von GRABAR und WILLIAMS (70, 71) in der Mikromodifikation von SCHEIDEGGER (193) auf Objektträgern in der Universal-Elektrophorese-Kammer[6] bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 25 mA sowie einer Laufzeit von 60 Minuten durchgeführt. Als Gel wurde ein 2%iger Reinagar[7] in 1:2 verdünntem Veronal-Na-Na-Acetat-Puffer pH 8,6 nach MICHAELIS (144)

---

1 Fa. MERCK, Darmstadt

2 Fa. HITACHI-PERKIN-ELMER 139 Spektr. Ph. bzw. DB Spektral-Photometer der Fa. BECKMAN

3 Fa. BOSKAMP, Gersel b. Bonn

4 Fa. SARTORIUS-Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen

5 Fa. ZEISS KG, Oberkochen

6 Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz

7 Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg

mit Cialit-Zusatz[1] verwendet. Die Färbung erfolgte mit Azocarmin in einer Eisessig-Methanol-Lösung (1:10 V/V).

Zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY

Die zweidimensionale Doppeldiffusion wurde nach der von OUCHTERLONY beschriebenen Methode (159, 160) mit 2%igem DIFCO-Agar[2] und Cialit-Zusatz auf Objektträgern durchgeführt. Die Reservoirs für das zu prüfende Material wurden in rosettenförmigen Mustern (6 bzw. 8 konzentrisch angeordnete Reservoirs mit einem Durchmesser von 2 mm um ein zentrales Reservoir mit einem Durchmesser von ebenfalls 2 mm) mittels einer speziellen Stanze[3] in den Agar gestanzt. Nach einer Diffusionszeit von 24 - 48 Stunden wurden die Präparate in isotonischer Kochsalz-Lösung für 24 Stunden gewässert, 24 Stunden lang unter Filterparier getrocknet und mit Azocarmin-Lösung gefärbt (s.o.) sowie in einer Eisessig-Methanol-Lösung (1:10 V/V) entfärbt.

Radioimmunoassay

Markierung

Die radioaktive Markierung von gereinigtem AFP bzw. CEA wurde mit ^{125}J (Na-Jodid)[4] nach der Chloramin T-Methode von HUNTER (97) vorgenommen (126).

Prinzip: Als mildes Oxidationsmittel führt Chloramin T Jodid in das reaktive Jod über, welches in Abhängigkeit von Reaktionsdauer und Konzentration in unterschiedlichem molarem Verhältnis vorwiegend in Tyrosingruppen von Proteinen eingebaut wird. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt bei 7,5; Reduktionsmittel wie z.B. Na-Disulfit führen zu ihrer augenblicklichen Unterbrechung. Um Schädigungen des zu markierenden Proteins und einen damit verbundenen Verlust an Immunoreaktivität so klein wie möglich zu halten, müssen durch Testung die geringsten Konzentrationen von Na-Jodid, Chloramin T und Na-Disulfit sowie die geringste Reaktionszeit ermittelt werden.

---

1 Fa. ASID, Lohof b. München
2 Fa. DIFCO Lab., Detroit, Michigan, USA
3 Fa. BOSKAMP, Hersel b. Bonn
4 Fa. FARBWERKE HOECHST AG, Frankfurt a. Main

Vor der Markierung wurde die kommerziell erworbene Menge von 1 mCi Na-^{125}J im Versandgefäß mit 70 µl 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,5 verdünnt. Die Markierung wurde in 1 ml-Kunststoff-Reagenz-Gefäßen[1] bei Raumtemperatur vorgenommen. Nacheinander wurden mit EPPENDORF-Pipetten[1] folgende Substanzen zusammengegeben und auf einem Spezial-Schüttler[1] gemischt:

20 µl ^{125}J als Na-Jodid ≙ 0,25 mCi (1. Aktivitätsmessung) = = eingesetzte Gesamtaktivität
10 µl Phosphatpuffer 0,5 M pH 7,5
20 µl Protein ≙ ca. 5 µg in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5
20 µl Chloramin T[2] (≙ 50 µg in 0,05 M Phosphatp. pH 7,5)

Nach Mischung Inkubation über 25 Sekunden, danach

25 µl Na-Disulfit[2] (≙ 12 µg in 0,05 M Phosphatp. pH 7,5) und
200 µl 0,05 M Phosphatp. mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA)

Reinigung des ^{125}J-markierten Proteins

Die nachfolgende Reinigung wurde zur Entferung von nicht gebundener Aktivität (1. Säule) als auch zur Gewinnung einer homogeneren markierten Proteinfraktion (2. Säule) vorgenommen. Folgende Säulen wurden am Tag vor der Markierung vorbereitet:

1. Säule (Sephadex G 50 Fine, 1 x 15 cm): Einweichen von 5 g Sephadex G 50 Fine für 6 Stunden in 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6; nach Entgasen (Wasserstrahlpumpe) Gießen der Säule. Nachwaschen mit 10 ml des gleichen Puffers. Vor ihrer Benutzung konnte die Säule mit 1 ml Veronal-Puffer mit 2% BSA vorlaufen.

2. Säule (Sephadex G 200, 1,5 x 35-40 cm): Einweichen von 5 g Gel in 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6 für 6 Stunden, nach Entgasen Gießen der Säule. Vor Benutzung wurde mit 50 ml Veronal-Puffer 0,1 M mit 0,1% BSA und 0,9% isotonischer Kochsalzlösung nachgewaschen.

Das gesamte Reaktionsgemisch des EPPENDORF-Gefäßes (s.o.) wurde einschließlich eines Nachspül-Volumens auf die 1. Säule aufge-

---

1 Fa. EPPENDORF, Hamburg 2 Fa. MERCK, Darmstadt

tragen und mittels eines Fraktionskollektors[1] mit Tropfenzähleinrichtung in 1 ml-Fraktionen in kleinen EPPENDORF-Gefäßen gesammelt, in die je 0,2 ml 0,07 M Veronal-Puffer mit 2,5% BSA vorpipettiert worden waren. Die Elution erfolgte mit 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6. Die Aktivitäten der Fraktionen wurden einschließlich der verlorenen Aktivität (Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen) in einem Gammazähler[2] gemessen (2. Aktivitätsmessung). Die 1 - 2 Fraktionen des Proteinpeaks mit der höchsten Aktivität wurden anschließend ohne vorherige Einengung auf die 2. Säule aufgetragen, mit oben genanntem Puffer eluiert, in 1 ml-Fraktionen gesammelt und im Gammazähler[2] gemessen (3. Aktivitätsmessung). Diese Fraktionen wurden nach dem aufgezeichneten Radioaktivitäts-Diagramm zu bestimmten Sammelfraktionen (z.B. aufsteigender bzw. absteigender Schenkel oder Maximum des Diagramms) gepoolt und zur weiteren Testung verwandt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte auf den programmierbaren Taschenrechnern HP 65 bzw. HP 97 der Fa. HEWLETT-PACKARD.

Testung des ersten Antikörpers (Antikörper-Verdünnungskurve)

Prinzip: Die Antikörper-Verdünnungskurve dient der Ermittlung einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers für die Standard-Inhibitionskurve des Radioimmunoassays. Sie erfordert deshalb die Benutzung einer konstanten geeigneten Verdünnung des Tracers (markiertes Antigen) und des 2. Antikörpers, die im Ansatz der variablen Konzentration des 1. Antikörpers in einer geometrischen Verdünnungsreihe gegenüberstehen. Zunächst werden konstante Mengen der 1. Antikörper-Verdünnungsreihe mit konstanten Mengen des markierten Proteins zusammengegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei Raumtemperatur werden die meist löslichen Immunkomplexe durch einen zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege, durch Immunisierung einer Ziege hergestellt) während einer weiteren Inkubationsphase von 24 Stunden bei Raumtemperatur zu größeren

---

4 Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden

2 BF 5300 der Fa. BERTHOLD, Karlsruhe

präzipitierenden Komplexen verstärkt, die zentrifugiert und nach Dekantierung des Überstandes im Gammazähler gemessen werden können.
Nach Vormessung und Berechnung wurde das markierte Antigen unter Kontrolle im Gammazähler auf eine Verdünnung von ca. 20 000 - 25 000 Counts/2 Min. und 100 µl eingestellt. Der 2. Antikörper wurde in einer Verdünnung zwischen 1:20 - 1:30 verwandt.
Pro Röhrchen wurden folgende Volumina pipettiert:

a) Total: 100 µl markiertes Antigen
b) N-Wert (unspezifische Bindung):
100 µl markiertes Antigen
400 µl Verdünnungspuffer (0,01 M Phosphatpuffer + + 1% BSA + 0,15 M NaCl + 0,4% EDTA-Titriplex + 0,02% NaN_3, mit 1 N NaOH auf pH 8,2 eingestellt), sonst wie c ohne 1. Antikörper
c) Probe: 200 µl RIA-Verdünnungspuffer + 5 - 10% Pferdeserum
100 µl markiertes Antigen (+ 1/200 stabilisiertes Kaninchen-Serum[1])
100 µl 1. Antikörper der ermittelten Verdünnung

Nach sorgfältiger Mischung des Doppel-Ansatzes und Inkubation bei Zimmeremperatur für 24 Stunden:

+ 100 µl 2. Antikörper

Nach erneuter Inkubation (24 Stunden, R.T.) wurden die Röhrchen 30 Minuten lang bei 1000 g und R.T. zentrifugiert, dekantiert, für 10 Minuten auf den Kopf auf einen saugfähigen Karton gestellt und danach vorsichtig mit Filterpapierschnitzel innen bis etwa 0,5 cm oberhalb des Bodens ausgewischt. Danach erfolgte die Zählung im Gammazähler für 60 oder 100 Sekunden pro Röhrchen (Berechnung der Aktivitätsprozent-Werte s. unter Berechnungen).

---

1 Fa. BEHRINGWERKE, Marburg

Standard-Inhibitionskurve (Standard-Verdrängungskurve)

Prinzip: Im Radioimmunoassay (RIA) konkurrieren markiertes und nicht markiertes Standard- bzw. Analysen-Antigen um freie Bindungsstellen an einer begrenzten Anzahl von Antikörpern. Die dabei entstehenden, meist löslichen Immunkomplexe werden in einer anschließenden Reaktion durch einen zweiten Antikörper, der gegen Immunoglobuline der Spezies des ersten Antikörper-Bildners gerichtet ist, oder durch Immunkomplex-Fällung wie z.B. durch gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung, Polyäthylenglycol-Lösung oder Zirconyl-Phosphat-Gel gefällt und können nach Dekantierung und Entfernung des nicht präzipitierten Überstandes (enthält nicht gebundene Aktivität) im Gammazähler gemessen werden. Die Standardmesskurve oder Eichgerade wird durch die Standard-Inhibitionskurve dargestellt, an der die entsprechenden Analysenproben später abgelesen und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor zur Endkonzentration berechnet werden können. Die Standard-Inhibitionskurve errechnet sich aus der relativen Verdrängung des markierten Antigens vom Antikörper durch die in der Standard-Verdünnungsreihe fallende Konzentration des gewünschten Standards (nicht markiertes Antigen); als Bezugsgröße in diesem System fungiert die maximale Bindung von markiertem Antigen und Antikörper ohne Standard (B_o = 100%). Die dabei auftretende Bindung wird in Prozenten der Gesamt-Aktivität (= Total) als Bindungskapazität bezeichnet; sie liegt in Doppel-Antikörper-RIA-Systemen meist zwischen 20 und 40%.
Folgende Volumina wurden als Doppelbestimmung angesetzt:

a) Total wie oben beschrieben (AFP und CEA)
b) N-Wert wie oben beschrieben (AFP) bzw. wie Leerwert ohne 1. Antikörper (CEA)
c) Standard, Leerwert und Analysenprobe s. Tabelle 3

Zu Standard, Leerwert und Analysenprobe erfolgte Zusatz von

100 µl 1. Antikörper sowie beim AFP-RIA von
100 µl markiertem Antigen (Tracer) + 1/200 Kaninchenserum[1].

---

1 Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg

Tabelle 3

ANSATZ DER STANDARD-LÖSUNG IN VERDÜNNUNGSPUFFER ENTSPRECHEND EINER GEOMETRISCHEN REIHE VON 320 - 2,5 NG IN 100 µL (AFP) BZW. 160 - 1,25 NG IN 100 µL (CEA) SOWIE DES LEERWERTES UND DER ANALYSENPROBE

AFP-	CEA-RIA	
Standard:		
200 µl		RIA-Verdünnungspuffer + 10% Pferdeserum
	100 µl	RIA-Verdünnungspuffer
	200 µl	normales CEA-freies bzw. -armes Humanserum (NHS)
100 µl	100 µl	Standardlösung
Leerwert:		
200 µl		RIA-Verdünnungspuffer + 10% Pferdeserum
100 µl	200 µl	RIA-Verdünnungspuffer
	200 µl	NHS
Analysenprobe:		
200 µl		RIA-Verdünnungspuffer + 10% Pferdeserum
	200 µl	RIA-Verdünnungspuffer
100 µl	200 µl	Analysen-Lösung (Patientenserum nativ oder verdünnt)

Beim CEA-RIA wurde vor Zugabe von

100 µl markiertem Antigen

6 - 7 Stunden bei 37°C vorinkubiert.
Nach Mischung auf einem VORTEX-Mixer[1] und Inkubation von 24 Stunden bei Zimmertemperatur wurden beiden Ansätzen (AFP und CEA)

100 µl 2. Antikörper in der Verdünnung 1:15

zugegeben.
Nach erneutem Mischen und einer Endinkubation von 24 Stunden

1 Fa. BENDER & HOBEIN, München

bei Raumtemperatur wurde wie oben beschrieben (Zentrifugation, Gammazähler) verfahren.
Für die Berechnung der Analysenproben-Konzentrationen mußten die Ergebnisse des CEA-RIA durch 2 dividiert werden, um die unterschiedlichen Standard- bzw. Analysenvolumina auszugleichen.

Immunoradiometrische Bestimmung von Ferritin im Serum

Für die immunoradiometrische Bestimmung von Ferritin in den Patientenseren wurde der kommerzielle Assay RIA-gnost Ferritin der Fa. BEHRINGWERKE AG verwandt. Durchführung und Auswertung des Assays erfolgten hierbei gemäß den Angaben des Herstellers.

2.3.2.2 PRÄPARATIVE VERFAHREN

2.3.2.2.1 Gewebe-Extraktion

2.3.2.2.1.1 Herstellung von salinen Gewebe-Extrakten

Die Extraktion von Proteinen aus Nierentumoren sowie aus normalem Nierengewebe erfolgte mit gepoolten Einzelproben bis zu einem Gesamtgewicht von etwa 700 Gramm. Hierzu wurde das Material zur langsamen schrittweisen Erwärmung am Morgen des Tages vor der Verarbeitung in eine Kühltruhe mit einer Temperatur von -20°C und am Abend in einen Kühlraum mit einer Temperatur von 4°C gegeben.
Am Tage der Extraktion wurde das Gewebe nach vollständigem Auftauen bei Zimmertemperatur (2 Stunden) gepoolt, mit einem doppelschneidigen Wiegemesser mechanisch zerkleinert und unter Zusatz von 2 ml physiologischer Kochsalzlösung (mit 1:10 000 Cialit-Zusatz) pro Gramm Naßgewebe in einem MULTIMIX[1] verarbeitet. Die weitere feindisperse Zerkleinerung erfolgte in einem maschinellen Homogenisator (VIRTIS "60" HOMOGENIZER[2]) mit rhomboiden Schermessern bei einer Umdrehungszahl von 16 000 RpM im Kühlraum (1 Stunde) und anschließend mittels eines Homogenisators nach POTTER-ELVEHJEM in 60 ml-Glas-Zylindern unter Verwendung eines motor-betriebenen teflon-beschichteten Pistills (Typ 53022)[3] bei 400 RpM. Die so erhaltene bräunlich bis rötlich gefärbte Suspension wurde mit einem gleichen Volumen isotonischer Kochsalzlösung versetzt und 24 Stunden lang im Kühlraum (4°C) gerührt. Danach wurde der Gewebebrei für 90 Minuten bei 20 000 g und einer Kühltemperatur von 1°C (SPINCO L2-65B mit Rotor Ti-15)[4] zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert (damit blieb das Fett größtenteils an der Wand des Zentrifugeneinsatzes hängen) und zur Entfernung der restlichen groben Fettbestandteile einer Papierfiltration (Blauband Nr. 589)[5] unter-

---

1 Fa. BRAUN AG, Kronberg/ts.
2 Fa. CENCO, Haan, Rhld.
3 Fa. BRAUN, Melsungen
4 Fa. BECKMAN INSTRUMENTS, California, USA
5 Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL

zogen, das Sediment verworfen. Der jetzt fast klare Extrakt mit einem Gesamtvolumen von ca. 3 - 4 Litern wurde in großen Dialyseschläuchen (Kaliber 38)[1] von 50 - 80 cm Länge für 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und anschließend mittels des AMICON-Systems[2] über eine Ultrafiltrationszelle (UF 400) mit der Ultrafiltrationsmembran PM 10 (Ø = 72 mm; Protein-Molekulargewicht-Retention bei ca. 12 500 d) im Kühlraum (4°C) konzentriert. Hierzu ließ sich das Gesamt-Dialysat am System über ein Vorratsgefäß (RS 4) mit einer Kapazität von 4 Litern anschließen, in das nach Erreichen eines vorläufigen Endvolumens von ca. 200 ml noch 2 Liter steriles destilliertes Wasser für eine Enddialyse gegeben wurde. Nach weiterer Einengung auf 70 - 90 ml wurde der Rückstand aus der Zelle abgesaugt, für 1 Stunde bei 163 000 g und einer Kühltemperatur von 1°C (SPINCO L2-65B mit Rotor Ti-75)[3] zentrifugiert, mit einem Druckfiltrationsgerät SM 16223[4] (Kapazität 20 ml; Stickstoff-Druck bis 20 kp/cm^2) unter Verwendung von Glasfaservorfilter und Filtern der Stärke 3,0, 0,6 und 0,2 µm (Ø = 25 mm) sterilfiltriert und abschließend lyophilisiert (Typ 290)[5]. Die mittels dieser Methode gewonnenen Extrakte erhielten die Bezeichnung HE 7/75 (Hypernephromgewebe, 1. Extraktion) bzw. HE 2a/76 (Hypernephromgewebe, 2. Extraktion) sowie NNE 7/75 (Normalanteil der Tumornieren, s. unter "Untersuchungsmaterial") bzw. NNE 3/76 (Spenderniere).

2.3.2.2.1.2 Herstellung von Perchlorsäure-Extrakten aus Tumorgewebe

Die Herstellung von Perchlorsäure-Extrakten aus Nierentumorgewebe wurde im wesentlichen nach den Angaben von KRUPEY und Mitarbeitern (119) mit geringfügigen Modifikationen vorgenommen. Das in der oben beschriebenen Weise mechanisch zerkleinerte und zusammen mit dem doppelten Volumen isotonischer Koch-

---

1 Fa. KALLE, Wiesbaden-Biebrich
2 Fa. AMICON, Oosterhout, Holland
3 Fa. BECKMAN INSTRUMENTS, California, USA
4 Fa. SARTORIUS-Membranfilter-Ges., Göttingen
5 Fa. M. CHRIST, Aichach-Oberbernach

salzlösung im MULTIMIX verarbeitete Tumormaterial wurde ebenfalls 1 Stunde bei 16 000 RpM und 4°C homogenisiert sowie mit einem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM gepottert. Sodann wurde der Gewebebrei unter Zugabe von 1 Volumen 1,2 M Perchlorsäure zu 1 Volumen Suspension und Rühren bei Zimmertemperatur für 30 Minuten extrahiert und anschließend 30 Minuten lang bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Papierfiltration des Überstandes zur Entfernung von groben Fettbestandteilen, Dialyse gegen fließendes Leitungswasser für 48 Stunden und Konzentrierung mittels des AMICON-Systems erfolgten in der bereits beschriebenen Weise. Nach erneuter Zentrifugation für 30 Minuten bei 10 000 g (CHRIST-Zentrifuge Typ UJ 15 000)[1] konnte der Extrakt sterilfiltriert (s. oben) und gefriergetrocknet werden. Das Lyophilisat erhielt die Bezeichnung HE 2b/76.

2.3.2.2.1.3 Zentrifugation

Alle Zentrifugationsschritte der salinen Gewebe-Extraktion erfolgten in der präparativen Vakuum-Ultrazentrifuge Modell SPINCO L2-65B der Fa. BECKMAN[2] bei einer Temperatur von 1°C und einem Druck von 0,001 Torr. Die Erstreinigung des gepotterten Homogenisates wurde hierbei mit dem Festwinkel-Rotor Typ 15 Ti[2] bei 14 000 RpM (20 000 g; g-Zahl bei gemitteltem Radius) für 90 Minuten, die Zentrifugation des konzentrierten Dialysates mit dem Festwinkel-Rotor Typ 75 Ti[2] bei 50 000 RpM (163 000 g) 60 Minuten lang durchgeführt.
Die erste Zentrifugation des Tumor-Perchlorsäure-Extraktes fand in einer HERAEUS-CHRIST-Zentrifuge Typ UJ 3 S[1] für 30 Minuten bei 3000 RpM, die Zentrifugation des dialysierten Endproduktes vor der Lyophilisation für 1 Stunde in einer CHRIST-Laborzentrifuge Typ UJ 15 000[1] bei 15 000 RpM (10 000 g) statt.

2.3.2.2.1.4 Filtration

Der dialysierte und auf etwa 80 bis 100 ml eingeengte Gewebe-

---

1 Fa. CHRIST, Osterode/Harz

2 Fa. BECKMAN INSTRUMENTS, California, USA

Extrakt wurde vor der abschließenden Lyophilisation mit einem Druck von 10 kp/cm^2 (Stickstoff-Pressluft) durch drei hintereinander geschaltete Filter (3,0; 0,6; 0,2 µm; davor Glasfaservorfilter) mittels des Druckfiltrationsgerätes SM 16223[1] (Kapazität von 20 ml, Ø = 25 mm) gepreßt.

2.3.2.2.1.5 Konzentrierung

Die Konzentrierung größerer Volumina von eiweißhaltigen Flüssigkeiten (über 100 ml), die bei der Extraktherstellung sowie als chromatographische Sammelfraktionen (s. unten) anfielen, erfolgte mittels des Ultrafiltrationssystems der Fa. AMICON[2] unter Verwendung der speziellen semipermeablen Ultrafiltrationsmembranen UM 5 (Ausschlußgrenze bei 1000 d) und PM 10 (ca. 12 500 d) (210). Hierzu wurden Lösungen je nach Quantität direkt in die Zelltypen UF 400, 200 bzw. 80 abgefüllt oder aber bei sehr großen Mengen (≧ 1000 ml) über ein Vorratsgefäß (RS 4) von 4-Liter-Kapazität am System angeschlossen. Die ca. 2 bis maximal 7 Tage dauernde Einengung wurde bei einem Filtrationsdruck von 5 kp/cm^2 (Stickstoff-Pressluft) im Kühlraum (4°C) vorgenommen und durch ein Sicherheitskontrollsystem (Endpoint-controller EC 20) vor unbeabsichtigter Überkonzentrierung geschützt. Zur Enddialyse von Gewebsextrakten wurde nach Erreichen eines vorläufigen Endvolumens von 200 ml noch das 10-fache Volumen steriles destilliertes Wasser in das Vorratsgefäß gegeben und unter gleichem Druck durch die Membranen gepreßt.

2.3.2.2.1.6 Lyophilisation

Den abschließenden Konzentrationsschritt der Gewebsextraktion stellte die Gefriertrocknung des entsalzten Materials mittels der Lyophilisiereinrichtung der Fa. M. CHRIST (Typ 290)[3] dar. Zu diesem Zweck wurden die sterilfiltrierten Extrakte in 60 - 80 ml-Portionen in 500 ml-Rundkolben gefüllt und nach kon-

---

1 Fa. SARTORIUS-Membranfilter-Ges., Göttingen

2 Fa. AMICON, Oosterhout, Holland

3 Fa. M. CHRIST, Aichach-Oberbernbach

zentrisch geschichtetem Einfrieren im Methanol-Bad (bei -70°C) an den Vakuumbaum des Gerätes angeschlossen.

2.3.2.2.2 Karton-Elektrophorese

Die präparative elektrophoretische Auftrennung von Extrakten wurde nach einem von KNEDEL und SPERL (112) beschriebenen präparativen Zonen-Elektrophorese-Verfahren unter Verwendung von Karton als Trägermaterial vorgenommen. Pro Lauf wurden 2 Elektrophorese-Kammern[1] à 3 Brücken mit je 6 Kartonstreifen der Größe 30 x 8 cm des Typs MN 866[2] und einer Extraktauftragsmenge von 1 ml (50 mg Protein) pro Streifen bestückt. Als Puffer diente ein Veronal-Na-Na-Acetat-Puffer pH 8,6 nach MICHAELIS (144) in einer Verdünnung von 1:1 mit 0,02% NaN_3-Zusatz. Bei einer Spannung von 200 V (6 - 12 V/cm Kartonstreifen) und einer Stromstärke von ca. 80 mA pro Kammer dauerte die Auftrennung ca. 15 - 17 Stunden. Nach Beendigung des Trennvorganges wurden die auf einer Länge von 12 cm aufgetrennten Proteinfraktionen nach einem von CONSDEN u. Mitarbeitern (37) angegebenen Abklatschverfahren auf Filterpapier übertragen, getrocknet und mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. An Hand dieses Elektropherogramms ließen sich dann die einzelnen Fraktionen mit einer Schere ausschneiden und mittels einer speziellen hydraulischen Preßvorrichtung[3] bei einem Druck von bis zu 20 to auspressen.

2.3.2.2.3 Chromatographie

2.3.2.2.3.1 Gelfiltration

Für die präparative Auftrennung von Tumorextraktproteinen nach ihrem Molekulargewicht (Molekularsieb-Chromatographie) gelangten verschiedene Sepharose- bzw. Sephadex G-Typen[4] zur Anwendung (43, 46, 64). Sepharose 6B ist ein perlförmiger Agarose-Typ mit 6% Agarose-Gehalt, einer Perlgröße im gequollenen Zustand von 40 - 210 µm und einer Protein-Ausschlußgrenze von

---

1 Fa. BENDER & HOBEIN, München 2 Fa. MACHERY & NAGEL, Düren
3 Fa. WEBER, Stuttgart
4 Fa. PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Schweden

4×10^6 d, deren Proteinauftrennung hauptsächlich oberhalb der Trenncharakteristik der Sephadex G-Typen erfolgt. Sepharose 6B wurde zur Auftrennung des Hypernephrom-Gesamtextraktes verwandt.
Sephadex G ist ein kugelförmiges polymerisiertes Dextran-Gel zur molekulargewichtsabhängigen Trennung von Proteinen. Je nach G-Typ werden unterschiedliche Fraktionsbereiche für Proteine je nach Partikelgröße und Quervernetzungsgrad der Gele erhalten:

Sephadex G-200	Partikelgröße	40 - 120 µm
	Trennbereich	5000 - 600 000 d
Sephadex G-100	Partikelgröße	40 - 120 µm
	Trennbereich	4000 - 150 000 d
Sephadex G-50 Fine	Partikelgröße	20 - 80 µm
	Trennbereich	1500 - 30 000 d
Sephadex G-25 Medium	Partikelgröße	50 - 150 µm
	Trennbereich	1000 - 5000 d.

Sephadex G-200 wurde ebenfalls zur Chromatographie des Tumor-Gesamtextraktes verwandt, vorwiegend jedoch als ein der Sepharose 6B nachgeschalteter Schritt zur Auftrennung von deren Protein-Fraktionen mit geringerem Molekulargewicht (chromatographische Sammelfraktionen) eingesetzt. Die hieraus resultierenden Protein-Fraktionen im Molekulargewichtsbereich unter 100 000 d wurden abschließend auf Sephadex G-100 gegeben.

Bei der Vorbereitung und dem Gießen der Säulen verfuhren wir nach den Angaben des Herstellers (195). Die Säulendimension betrug 2,5 x 90 cm; als Elutionspuffer verwandten wir 0,05 M Tris-HCl pH 6,0 in 0,1 N NaCl mit 0,02% NaN_3-Zusatz.
Alle Extrakt-Proben wurden in diesem Puffer aufgenommen und vor der chromatographischen Trennung in einer CHRIST-Laborzentrifuge Typ UJ 15 000[1] für 1 Stunde bei 15 000 RpM (10 000 g) zentrifugiert. Das Auftragen des Überstandes erfolgte sodann über spezielle, zu den jeweiligen Säulentypen gehörige Auftragsbecher, die mittels eines Fadens hängend montiert das Gelbett gerade touchierten (keine Kompression des Gelbettes durch das

---

1 Fa. CHRIST, Osterode/Harz

Eigengewicht des Bechers) und nach Einwandern der Extraktbande sowie einer anschließend überschichteten Puffermenge von ca. 6 ml vorsichtig entfernt wurden.
Sephadex G-50 Fine wurde in 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6 für die Herstellung einer Säule (1 x 15 cm) zur Erstreinigung von ^{125}J-markiertem CEA und AFP herangezogen; die Endreinigung erfolgte auf Sephadex G-200 (CEA, Säulendimension 1,5 x 35 cm) bzw. Sephadex G-100 (AFP, Säulendimension 1,5 x 35 cm) mit gleichem Puffer.
Sephadex G-25 Medium wurde in destilliertem Wasser eingeweicht und zum Gießen einer Säule (1 x 15 cm) für die Entsalzung von reinsten (CEA, AFP) bzw. vorgereinigten Fraktionen vor der Lyophilisation verwandt.

2.3.2.2.3.2 DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher

Die chromatographische Isolierung der IgG-Fraktionen von Immunseren erfolgte mittels des Anionenaustauschers DEAE-Zellulose[1] (171, 172, 201, 202) mit einer Kapazität von 0,6 - 1,0 mÄqu./g in einem pH-Bereich zwischen 4,5 und 8,0, wobei Vorbereitung und Gießen der Säulen sowie Auftragen und Gradientenwahl im wesentlichen nach den Angaben von KNEDEL et al. (113, 114) vorgenommen wurden.
DEAE-Zellulose wurde in 0,01 M Na-Phosphatpuffer mit 0,02% NaN_3-Zusatz unter kontinuierlicher Drucksteigerung bis 0,5 kp/cm^2 mittels Preßluft zu Säulen der Dimension 2,0 x 34 oder 2,5 x 41 cm gepackt. Das zuvor 24 Stunden bei 4°C gegen das 50- bis 100-fache Volumen Startpuffer (0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0, der über eine Rühreinrichtung mit Rührmagnet in Bewegung gehalten wurde) dialysierte (KALLE-Dialyseschläuche Kaliber 20) und anschließend 1 Stunde bei 10 000 g zentrifugierte Antiserum wurde auf die drainierte Zellulosebett-Oberfläche aufgetragen und sein Einwandern in die Säule mit leichtem Druck (Preßluft) beschleunigt. Die Elution fand über eine Vario-Perpex-Schlauchpumpe[2] unter kontinuierlicher Aufzeichnung der bei 254 nm (Uvicord I)[2] bzw. 280 nm (Uvicord II)[2] gemesse-

---

1 Fa. SERVA, Heidelberg 2 Fa. LKB, Bromma, Schweden

nen Absorptionswerte statt. Nach vollständigem Erscheinen des ersten Haupt-Peaks - einer weitgehend reinen IgG-Fraktion - wurde durch Anschluß des Grenzpuffers (0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 4,5 in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben) an das den Startpuffer enthaltende Mischgefäß (1 Liter-Rundkolben mit Rührmagnet, 2 Bodenabfluß-Öffnungen) die Ausbildung eines kontinuierlichen konvexen Molaritäts- und pH-Gradienten erzielt und die Elution des Immunserums abgeschlossen. Gemäß den Haupt-Peaks der Chromatographie-Kurve wurden die gesammelten Einzelreagenzgläser (s. später) zu Fraktionen vereinigt, eingeengt (s. später) und in 0,5 - 1 ml-Portionen bei -20°C gelagert.

2.3.2.2.3.3 Immunadsorption (Affinitäts-Chromatographie)

Als abschließender Schritt zur Reinigung des Tumorextraktes und zur Gewinnung von neuem Ausgangsmaterial für Immunisierungen wurde die Affinitäts-Chromatographie (11, 41) unter Verwendung von CNBr-aktivierter Sepharose 4B[1] herangezogen.
Prinzip: Die genaue Struktur der Sepharose nach ihrer Aktivierung mit CNBr ist bis heute unbekannt. Nach der meistvertretenen Hypothese reagiert CNBr mit den Hydroxylgruppen der Sepharose unter Ausbildung von zyklischen und azyklischen Imidokarbonatgruppen (5), die dann bei Kontakt mit geeigneten Liganden mit deren primären Aminogruppen unter Bildung von kovalenten Bindungen reagieren. An letzterem Vorgang sind jedoch wahrscheinlich neben den Imidokarbonatgruppen noch in der aktivierten Sepharose ebenfalls präsente Cyanat-Estergruppen beteiligt (118). Nach Bindung des gewünschten Proteins - in unserem Fall gereinigte Antikörper-Fraktionen von Kaninchen-Immunseren - und Blokkierung der restlichen aktiven CNBr-Gruppen gehen anschließend über die Säule gegebene Proteine bei Elution im alkalischen Milieu nur dann eine Bindung ein, wenn es sich hierbei um homologe Antigene des fixierten Antikörpers handelt. Sind nun immunologisch nicht gebundene Proteine nach einer gewissen Elutionszeit vollständig ausgewaschen, läßt sich die Antigen-Antikörper-Bindung durch unspezifische Maßnahmen wie Senkung des

---

1 Fa. PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Schweden

pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke des eluierenden Mediums wieder lösen und auf diese Weise das spezifische Antigen gewinnen. Dieser Vorgang ist mehrmals wiederholbar. Herstellung und Betrieb der Säulen erfolgte im wesentlichen nach den Angaben des Herstellers (2).

Zum Quellen und zur Entfernung der stabilisierenden Dextran- und Lactulose-Zusätze wurde das abgewogene Trockengel (1 g lyophilisiertes Gel pro 10 mg Antikörper, insgesamt 10 - 15 g) 15 Minuten lang in 2 Liter 0,001 M HCl gewaschen und danach auf einer Glasfritte (Größe 3)[1] bis auf 100 ml abgesaugt. 100 - 150 mg Antikörper wurden in 100 ml 0,1 M $NaHCO_3$ mit 0,5 M NaCl pH 8,3 aufgenommen, mit dem so behandelten Gel vermischt und anschließend in 20 ml Plastikröhrchen 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur auf einem Horizontal-Rotator langsam überkopf gedreht und inkubiert. Das Auswaschen von ungebundenem Antikörper erfolgte auf der Glasfritte mit Na-Bikarbonatpuffer; sodann wurde eine Blockierung der überschüssigen aktiven Gruppen durch Inkubation des Gels mit 1 M Glycin-Lösung pH 8,0 über 2 Stunden bei Raumtemperatur vorgenommen. 3 Waschzyklen mit 0,1 M Acetat-Puffer pH 4,0 in 1 M NaCl bzw. 0,1 M Boratpuffer pH 8,0 in 1 M NaCl im Wechsel dienten zur Entfernung noch verbliebener Spuren von nicht kovalent gebundenem Antikörper. Abschließend wurde das Gel in einer kleinen Säule (1 - 1,5 x 15 - 20 cm) gegossen.

Als Startpuffer zum Vorlaufen der Säule sowie zur Elution der unspezifischen Proteine wurde 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit 0,5 M NaCl benutzt. Gegen diesen Puffer wurden alle Fraktionen vor dem Auftragen dialysiert, bei Auftrennung von Gesamtextrakt wurde das lyophilisierte Material in ihm gelöst und danach 10 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert. Die Chromatographie fand bei Zimmertemperatur unter kontinuierlicher Aufzeichnung der mittels eines empfindlichen Durchflußspektralphotometers (Prismen-Zweistrahl-Photometer DB)[2] gemessenen Absorptionswerte durch einen linearen Kompensationsschreiber (Recorder 1100)[3] statt. Nach vollständiger Elution des ersten Hauptpeaks und

---

1 Fa. SCHOTT, Mainz 2 Fa. BECKMAN INSTRUMENTS, Calif., USA
3 Fa. W+W ELECTRONIC AG, Basel, Schweiz

etwa einstündigem Nachwaschen mit Startpuffer konnten durch Anschluß des Endpuffers (0,2 M Glycin-HCl-Lösung pH 2,8 mit 0,5 M NaCl) die spezifisch gebundenen Proteine gewonnen werden. Diese sauren Fraktionen wurden unmittelbar nach ihrer Elution mit Startpuffer neutralisiert und anschließend gepoolt, konzentriert, entsalzt und nach Prüfung lyophilisiert.
Zur Reinigung von Ferritin- bzw. Lactoferrin-haltigen Fraktionen gelangten anstelle der oben genannten Puffer als Startpuffer PBS (isotonische NaCl-Lösung mit 0,02 M Na-Phosphat und 0,02% NaN_3, pH 7,3) sowie als Endpuffer PBS mit 2 M Kaliumthiocyanat zur Anwendung.

2.3.2.2.3.4 Konzentrierung

Die Elution aller Säulen fand unter kontinuierlicher Absorptionsmessung und Sammlung von 6 ml-Portionen mittels eines Fraktionskollektors[1] mit Tropfenzähleinrichtung statt, die danach an Hand der Chromatographiekurven zu Fraktionen vereinigt wurden. Größere Volumina (über 100 ml) wurden mittels des AMICON-Systems (s. oben) vorkonzentriert und erst anschließend ebenso wie die restlichen Fraktionen durch Druckfiltration mit Kollodiumhülsen (SM 132 00)[2] aus Zellulose-Nitrat (15 x 75 mm) unter Anwendung der Haltevorrichtungen SM 16311[2] eingeengt. Diese Hülsen mit einer Protein-Retentionsgrenze bei 10 000 - 15 000 d befinden sich in einem je nach Erfordernis modifizierbaren wässrigen Milieu, über dem das Vakuum einer Wasserstrahlpumpe angreift und damit eine Druckfiltration durch den atmosphärischen Druck bewirkt. In der Regel wurde jede Fraktion gegen den Puffer, der für den folgenden Trennschritt benötigt wurde, eingeengt und auf diese Weise gleichzeitig mit dem Konzentrierungsvorgang dagegen dialysiert.

---

1 Fa. LKB, Bromma, Schweden

2 Fa. SARTORIUS-Membranfiltergesellschaft, Göttingen

2.3.2.3 HERSTELLUNG VON ANTISEREN

Immunisierung

Sämtliche Immunisierungen wurden ausschließlich mit Immunhasen (weiße Neuseeländer, Grauschecken) durchgeführt.
Als Immunisierungsmaterial dienten sowohl Lösungen der Gesamtextrakte als auch säulenchromatographisch vorgereinigte Fraktionen inklusive der mittels der Affinitätschromatographie gewonnenen Antigenfraktionen.
Für die Immunisierung wurde ein Schema von HIJMANS et al. (93) in leicht modifizierter Form herangezogen:
Jede Immunisierungsreihe wurde mit 2 subkutanen Applikationen im Abstand von einer Woche unter Verwendung von 5%igen (bei salinen Extrakten) bzw. 0,5%igen (PCA-Extrakt, säulenchromatographische Fraktionen) Antigenlösungen begonnen. 0,5 - 1 ml dieser Suspension wurde jeweils mit dem gleichen Volumen kompletten Freund'schen Adjuvans[1] (1. Injektion) bzw. inkompletten Freund'schen Adjuvans[1] (2. Injektion) gut durchmischt und anschließend in alle 4 Fußsohlen (0,2 - 0,3 ml/Fußsohle) sowie je nach verbleibender Menge zusätzlich i.m. gespritzt. 3 Wochen nach der 2. Applikation folgte eine intravenöse Immunisierungsserie von wöchentlich 2 Injektionen über 3 Wochen in steigenden Dosen einer KAl-präzipitierten Antigenlösung, die fogendermaßen hergestellt wurde:

2,5 ml PBS mit 10 - 20 mg Antigen
+ 1,15 ml 1 N Bikarbonatlösung
+ 2,5 ml 10%ige KAl-Sulfatlösung.

Dieses Gemisch wurde nach Inkubation über 24 Stunden bei 4°C 30 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert, das Präzipitat nach Verwerfen des Überstandes in 4 ml PBS resuspendiert und bis zur Weiteren Verwendung in 0,5 ml-Portionen eingefroren. Mit dieser Antigenlösung wurde nach folgendem Schema immunisiert:

---

1 Fa. DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan USA

1. Woche	0,05 ml	0,1 ml	i.v.
2. Woche	0,1 ml	0,2 ml	i.v.
3. Woche	0,2 ml	0,4 ml	i.v.

Eine Woche nach der letzten Injektion wurde jedem Hasen eine Blutprobe entnommen, 1 Stunde bei 37°C sowie über Nacht bei 4°C stehengelassen und danach 15 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert. Das dekantierte Serum wurde nach der Doppeldiffusionsmethode von OUCHTERLONY auf spezifische und unspezifische Antikörper getestet. Ergab sich eine suffiziente Antikörperbildung, wurde das Kaninchen nach Ablauf einer weiteren Woche entblutet. Bei zu geringer Konzentration an spezifischen Antikörpern wurde der Versuch einer nochmaligen Boosterung durch mehrere 1 wöchentliche i.v.-Injektionen von 0,4 - 0,6 ml der KAl-präzipitierten Antigen-Suspension unternommen. War auch dann keine ausreichende Antikörperbildung erkennbar, wurde die Immunisierung abgebrochen.

Absorption

Waren Antikörper gegen Normalserum- oder Normalextrakt-Proteine nachweisbar, wurde die minimale, jeweils zur Vollabsorption benötigte Menge lyophilisierten Antigens in einer Absorptionsreihentestung mit Hilfe der OUCHTERLONY-Technik ermittelt und in dem Antiserum gelöst. Nach Inkubation von 1 Stunde bei 37°C sowie über Nacht bei 4°C wurde das Immunserum 1 Stunde bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand auf Verunreinigungen geprüft. Waren solche noch vorhanden, wurde erneut entsprechendes Antigen zugesetzt; andernfalls erfolgte nun die Absorption des Serums mit gewaschenen Erythrozyten der Gruppe AB und 0. Hierzu wurde Erythrozytenkonzentrat und sterile isotonische Kochsalzlösung zu gleichen Teilen in 20 ml-Zentrifugengläser gefüllt, vorsichtig durchmischt und 10 Minuten bei 550 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dem Sediment erneut das gleiche Volumen Kochsalzlösung zugegeben. Nach drei- bis viermaliger Wiederholung dieses Vorganges wurde das hämolysefreie Erythrozytenkonzentrat mit dem vorher dekomplementierten (30 Minuten bei 56°C) Antiserum im Volumenverhältnis 1:1 versetzt und gut gemischt, sodann 1 Stunde bei 37°C inkubiert und

rezentrifugiert. Das Serum wurde mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und solange mit frischen gewaschenen Erythrozyten absorbiert, bis keine mikroskopisch sichtbaren Agglutinate mehr nachgewiesen werden konnten.
Die nach dieser Absorptionsprozedur noch brauchbaren Antiseren wurden abschließend zur Gewinnung von reinen IgG-Fraktionen in der bereits beschriebenen Weise der DEAE-Zellulose-Chromatographie unterzogen, da der hiermit gewonnene Immunglobulinanteil nach Testung stets die überwiegende Menge spezifischer Antikörper enthielt.

2.3.2.4 BERECHNUNGEN

Sämtliche Berechnungen erfolgten mit eigenen Programmen auf den programmierbaren Taschenrechnern HP 65 und HP 97 der Fa. HEWLETT-PACKARD.

Methodische Auswertung des Radioimmunoassays

Die Berechnung der Bindungsaktivitäten der Standards als Prozente des Leerwertes (Standard 0 = höchstmögliche spezifische Bindung von ^{125}J-Antigen im Assay) läßt sich nach folgender allgemeiner Formel:

$$\text{Bindungsaktivität } \frac{B}{B_0} = \frac{B - N}{B_0 - N} \times 100\ (\%)$$

vornehmen, wobei

B = Zählrate der gebundenen Aktivität der Probe

B_0 = Zählrate der gebundenen Aktivität des Leerwertes und

N: N-Wert = Zählrate der unspezifisch durch den 2. Antikörper gebundenen Aktivität

ist.

Die anschließende zeichnerische wie rechnerische Auswertung erfolgte nach dem Logit-Log-Verfahren von RODBARD et al. (183), das auf der bisher für viele RIA-Systeme bewiesenen linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus der Antigenkonzentration und dem Logit-Wert der Bindungsaktivität basiert. Der Logit-Wert errechnet sich aus dem Logarithmus naturalis des Quotienten aus der Bindungsaktivität in % und der Differenz zwischen 100 und der Bindungsaktivität in %:

$$l = \ln \frac{p}{100 - p}$$

l = Logit, p = Bindungsaktivität.

Nach dem im Rechenprogramm für jeden Bindungsaktivitätswert an-

gegebenen Logit-Wert für die Standards läßt sich auf Logit-Log-Papier eine Gerade konstruieren, die der Beziehung

Y (Logit) = A (Ordinatenabschnitt) + B (Steigung) x X (Log. conc.)

folgt.
Dieser Schritt läßt sich jedoch auch durch einen zweiten Rechenschritt ersetzen, nach dem im Programm für die Koordinatenpaare der Standards die zugehörige lineare Regressionsgeraden-Gleichung nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate ermittelt und zusammen mit dem linearen Korrelationskoeffizienten r, der Standardabweichung der Geraden $s_{y.x}$ und den Geraden-Parametern A und B ausgegeben wird. Für jeden einzelnen Logit-Wert einer Analysenprobe berechnet das Programm dann den zugehörigen Logarithmus der Konzentration, der nach Entlogarithmierung und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die gesuchte Antigenkonzentration ergibt.

Statistische Berechnungen

Statistische Kennwerte wie arithmetisches Mittel ($\bar{x}$), Standardabweichung (s), Varianz (s^2), Variationskoeffizient (V.K.), Anzahl (N) etc. wurden entsprechend der einschlägigen Literatur (188) berechnet.
Für die von der Normalverteilung abweichenden Kollektive erfolgte der Vergleich der Verteilungsfunktion nach dem U-Test, der Vergleich abhängiger Beobachtungen nach dem WILCOXON-Test für Paardifferenzen.
Häufigkeitsdaten wurden auf Grund der kleinen Stichprobenumfänge durch den exakten Test von FISHER überprüft.

2.3.3 E I G E N E E R G E B N I S S E

2.3.3.1 METHODISCHER TEIL

2.3.3.1.1 Gewebe-Extraktion

Eine Zusammenfassung sämtlicher Extraktions- und Reinigungsschritte in Form von Flußdiagrammen zeigen die Tabellen 5 bis 7.
Nierenkarzinom- und normales Nierengewebe wurden in der unter Methodik genauer beschriebenen Weise verarbeitet und als saline (HE 7/75, HE 2a/76, NNE 7/75, NNE 3/76) bzw. Perchlorsäure- (HE 2b/76) Eiweißextrakte erhalten. Auskunft über die Ausbeute gibt Tabelle 4:

Tabelle 4
EXTRAKTAUSBEUTE

Gewebe	Extrakt	Naß-	Lyophilisat-Gewicht
3 Hypernephromnieren	HE 7/75	626 g	12,3 g
7 Hypernephromnieren	HE 2a/76	425 g	12,4 g
	HE 2b/76	425 g	0,76 g
Normalanteil von 2 Hypernephromnieren	NNE 7/75	120 g	3,42 g
1 Spenderniere	NNE 3/76	70 g	1,7 g

Abbildung 1 zeigt die CAF-elektrophoretische Auftrennung von salinem Hypernephrom- und Nierengewebsextrakt im Vergleich zu einem Normalserum, in Abbildung 2 ist eine immunelektrophoretische Untersuchung derselben Gewebspräparationen gegen ein polyvalentes Anti-Humanserum vom Kaninchen (ebenfalls im Vergleich zu einem Normalserum), in den Abbildungen 3 und 4 eine Untersuchung von NNE 7/75, HE 7/75 und HE 2b/76 gegen monospezifische Anti-Humanseren im OUCHTERLONY-Test wiedergegeben. Aus den Abbildungen kann man ersehen, daß die salinen Extrakte

Tabelle 5

G E W E B E - E X T R A K T I O N

A) S A L I N E E X T R A K T I O N

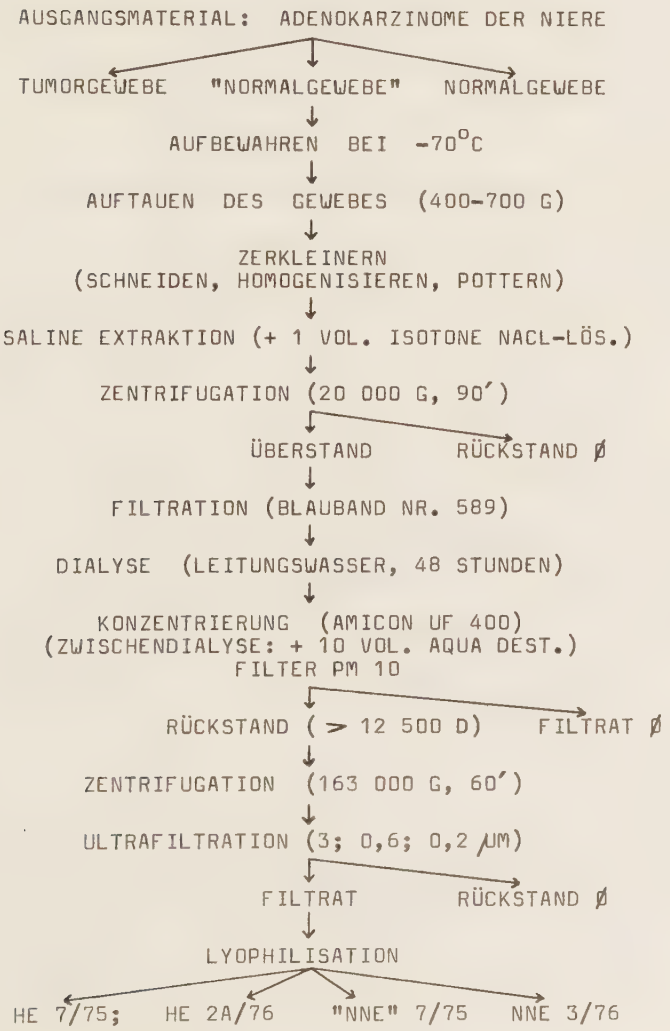


Tabelle 6

B) P E R C H L O R S Ä U R E - E X T R A K T I O N

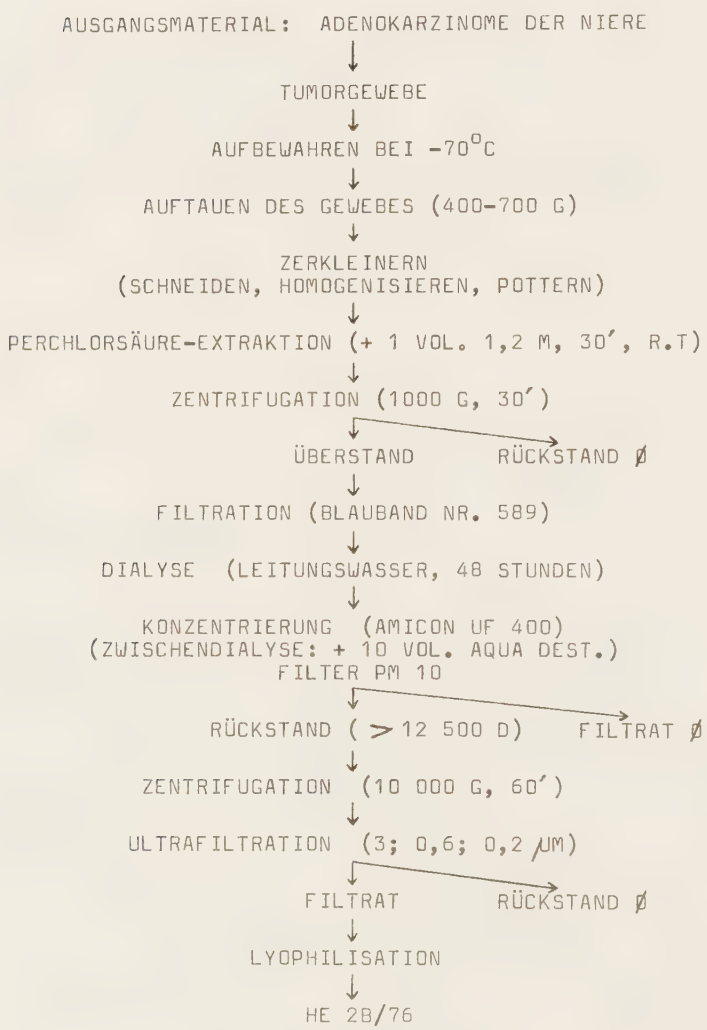
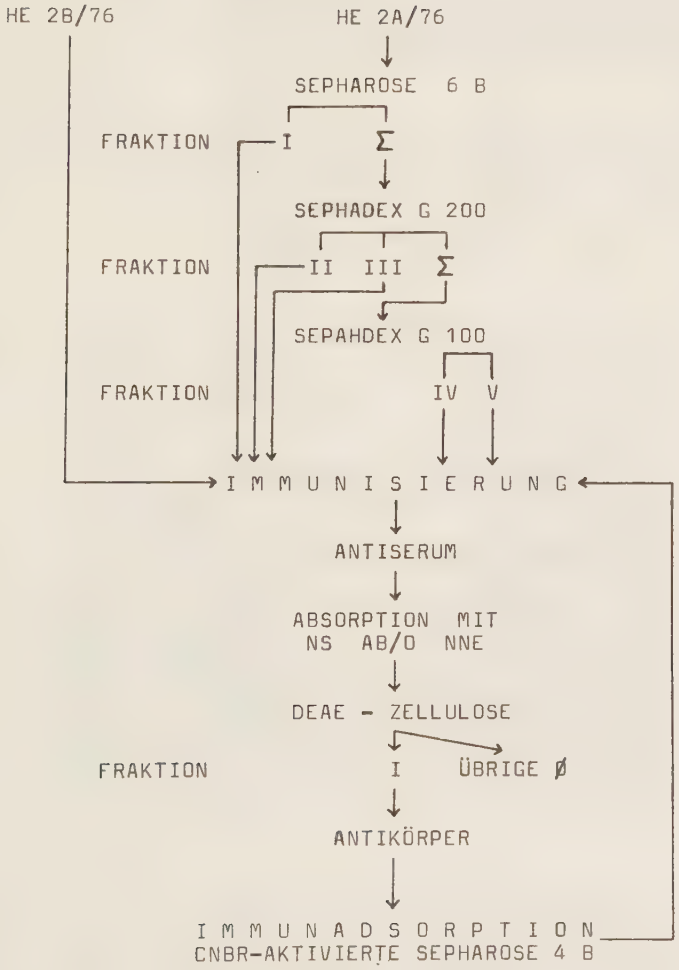


Tabelle 7

S Ä U L E N C H R O M A T O G R A P H I E



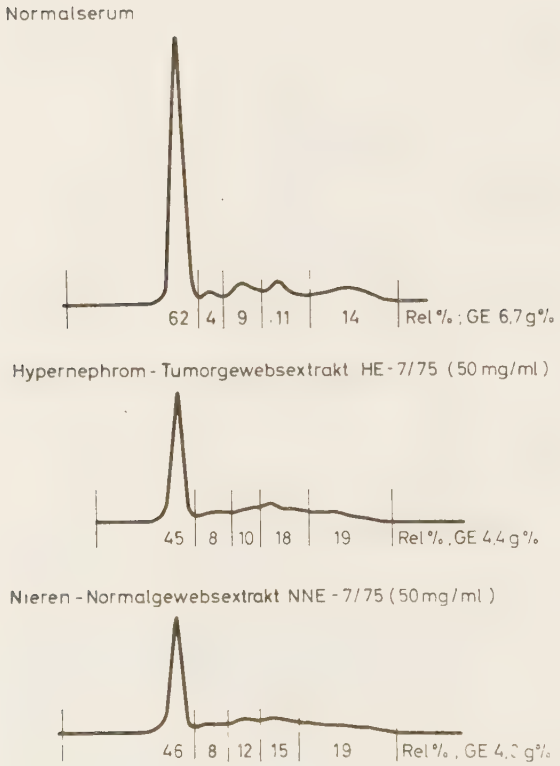


Abbildung 1

Elektropherogrammauswertung der CAF-elektrophoretischen Untersuchung von Hypernephromgewebs-Extrakt (HE 7/75) und Nieren-Normalgewebs-Extrakt (NNE 7/75) im Vergleich zu einem Normalserum.
Anode linksseitig; Auftrennung bei pH 8,6.

Abbildung 2

Immunelektrophoretische Untersuchung von Hypernephrom- (HE 7/75) und normalem Nierengewebsextrakt (NNE 7/75) im Vergleich zu einem Normalserum (NS) und im Ansatz gegen polyvalentes Anti-Human-Serum (AHS) vom Kaninchen.

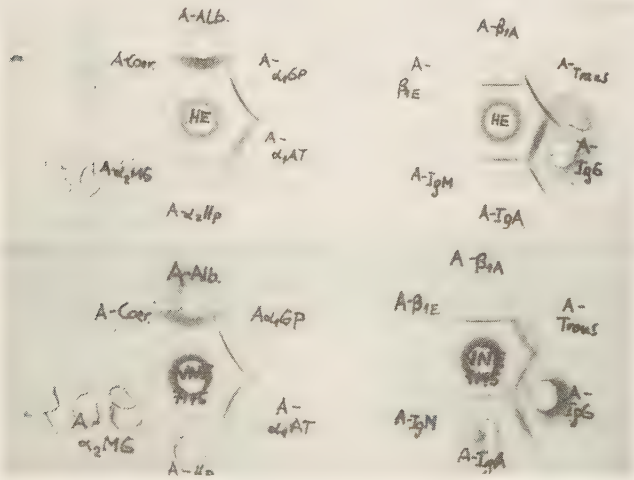


Abbildung 3

OUCHTERLONY-Untersuchung des Hypernephrom- (HE 7/75) und des normalen Nierengewebsextraktes (NNE 7/75) im Ansatz gegen verschiedene monovalente Anti-Humanprotein-Seren vom Kaninchen. A-Alb. = Anti-Albumin-Serum; A-Alpha$_1$-GP = Anti-Alpha$_1$-Glykoprotein-Serum; A-Alpha$_1$-AT = Anti-Alpha$_1$-Antitrypsin-Serum; A-Hp = Anti-Haptoglobin-Serum; A-Alpha$_2$-MG = Anti-Alpha$_2$-Makroglobulin-Serum; A-Coer. = Anti-Coeruloplasmin-Serum; A-Beta$_{1E}$ = Anti-Beta$_{1E}$-Globulin-Serum; A-Beta$_{1A}$ = Anti-Beta$_{1A}$-Globulin-Serum; A-Trans = Anti-Transferrin-Serum; A-IgG, A-IgA, A-IgM = Antiseren gegen die Immunglobuline IgG, IgA und IgM.

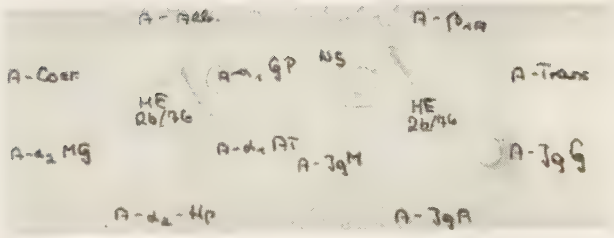


Abbildung 4

OUCHTERLONY-Untersuchung des Perchlorsäureextraktes aus Hypernephromgewebe (HE 2b/76) im Ansatz gegen verschiedene monovalente Anti-Humanprotein-Seren vom Kaninchen. Erklärung der Abkürzungen s. Abb. 3.

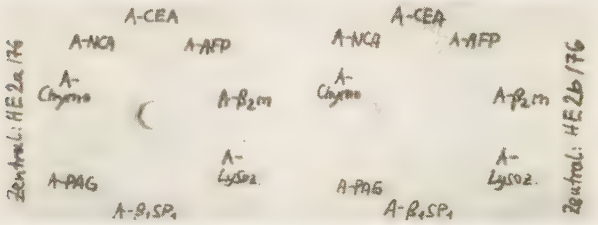


Abbildung 5

OUCHTERLONY-Untersuchung von HE 2a/76 und HE 2b/76 im Ansatz gegen folgende monovalente Antiseren: Anti-CEA, Anti-AFP, Anti-Beta$_2$-Mikroglobulin (A-B$_2$m), Anti-Lysozym (A-Lysoz.), Anti-Beta$_1$-SP$_1$, Anti-PAG, Anti-Alpha$_1$-Antichymotrypsin (A-Chymo) und Anti-NCA.

alle wesentlichen Serumproteine wie Albumin, verschiedene Alpha$_1$- und Alpha$_2$-Globuline, Transferrin und IgG-Globuline enthalten. In der immunelektrophoretischen Auftrennung ist Alpha$_2$-Makroglobulin nicht zu erkennen, desgleichen läßt sich hier keine Aussage über IgA und IgM treffen, da dieses Immunglobuline im vorliegenden Plättchen auch nicht im Referenzserum nachweisbar sind. Wie die OUCHTERLONY-Untersuchung jedoch zeigt, sind die Proteine mit Ausnahme von IgM in den Präparationen vorhanden. Im Perchlorsäureextrakt aus Hypernephromgewebe (HE 2b/76) sind von den überprüften Serumproteinen nach Abbildung 4 nur

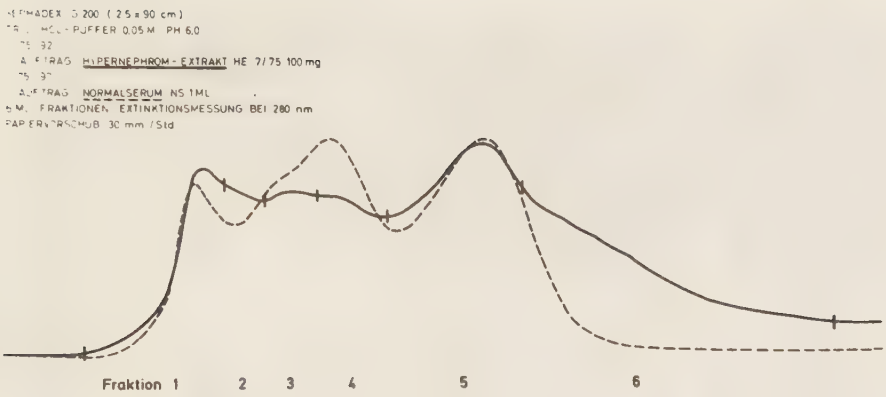


Abbildung 6

Säulenchromatogramm des mittes Sephadex G 200-Gelfiltration fraktionierten Hypernephromextraktes HE 7/75 (durchgezogene Linie) im Vergleich zum Chromatogramm eines unter gleichen Bedingungen aufgetrennten Normalserums (gestrichelte Kurve).

Albumin, Alpha$_1$-Antitrypsin und Alpha$_1$-Glykoproteid enthalten.

In beiden Eiweißextrakten konnte darüberhinaus Alpha$_1$-Antichymotrypsin, jedoch keiner der bekannten Tumormarker wie CEA, AFP, Beta$_2$-Mikroglobulin, Lysozym, PAG (= pregnancy associated globulin, auch SP$_3$), Beta$_1$-SP$_1$ (Beta$_1$-specific placental protein, auch SP$_1$) oder NCA (nonspecific crossreacting antigen) gefunden werden (Abb. 5).

2.3.3.1.2 Gelfiltration

Vorexperimente zur weiteren Reinigung des Tumorgesamtextraktes mittels Gelfiltration wurden auf Sephadex G 200 durchgeführt. In Abbildung 6 ist das typische Chromatogramm einer solchen Fraktionierung im Vergleich zur Auftrennung eines Normalserums (unter denselben Bedingungen auf der gleichen Säule) zu sehen. Ähnlich dem Normalserum mit den charakteristischen drei Protein-Hauptpeaks I (Makroglobuline wie z.B. Alpha$_2$-Makroglobulin, IgM), II (vorwiegend IgG, IgA und Alpha/Beta-Globuline)

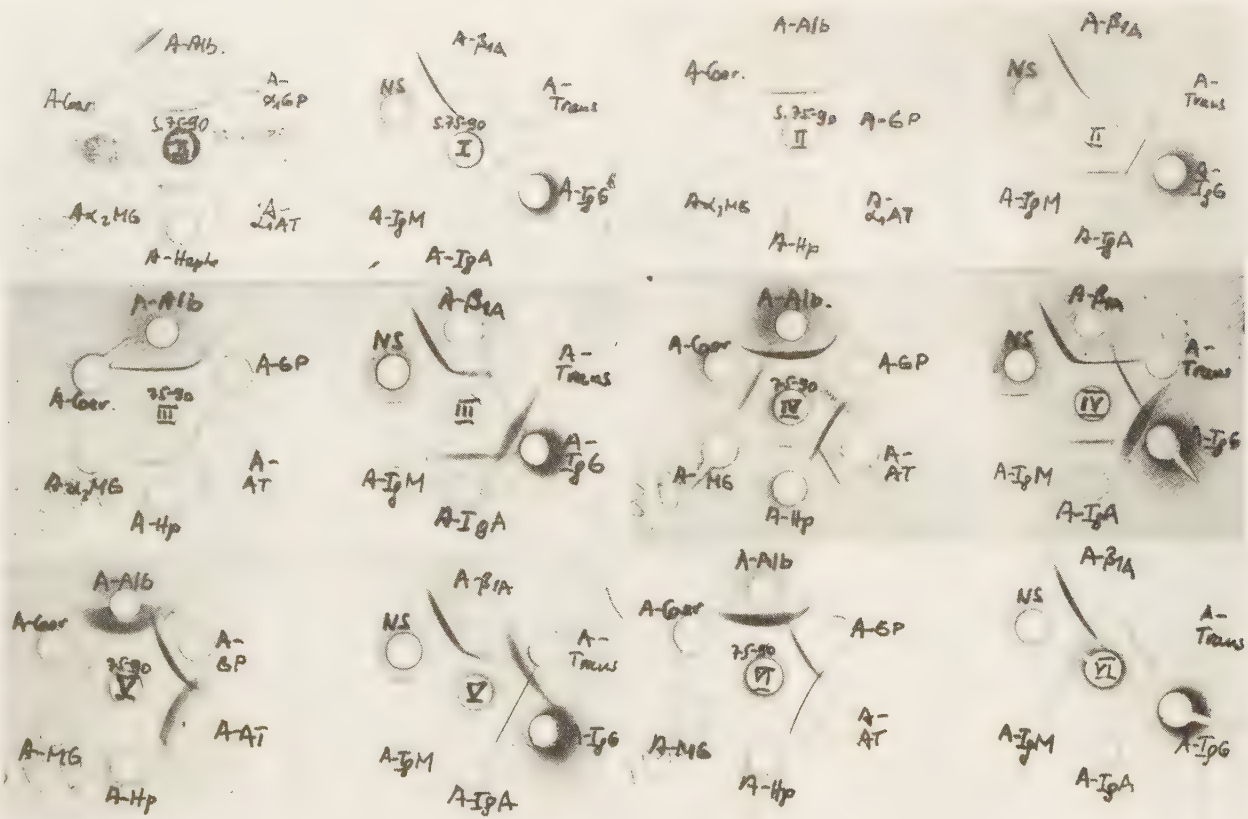
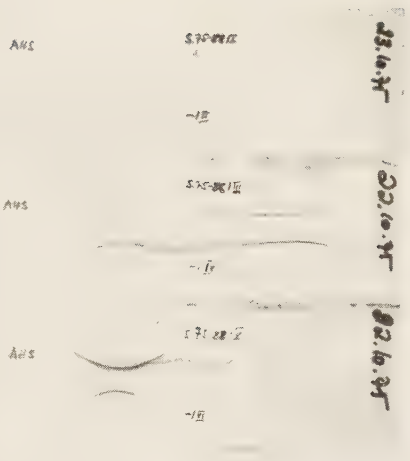


Abbildung 7

OUCHTERLONY-Untersuchung der Einzelfraktionen des auf Sephadex G 200 aufgetrennten HE 7/75 im Ansatz gegen verschiedene monovalente Anti-Humanprotein-Seren vom Kaninchen. Erklärung der Abkürzungen s. Abb. 3.

Abbildung 8

Immunelektrophoretische Untersuchung der Einzelfraktionen des auf Sephadex G 200 aufgetrennten HE 7/75 im Ansatz gegen polyvalentes Anti-Human-Serum (AHS) vom Kaninchen.



und III (vor allem Albumin, Alpha$_1$-Antitrypsin und Alpha$_1$-Glykoprotein) sowie einem viel später eluierten kleineren Peptidpeak (in Abb. 6 nicht dargestellt) gliedert sich auch der Kurvenverlauf des salinen Hypernephromextraktes deutlich in drei Abschnitte, die vorläufig in sechs Fraktionen aufgeteilt wurden und deren Gehalt an Serumproteinen mit Ausnahme des Fehlens von IgM keine wesentlichen Unterschiede zu einem chromatographierten Normalserum aufweist (Abbildungen 7 und 8).

Im Sinne einer wirksameren Auftrennung des auf Sephadex G 200 z.T. nur sehr diskret fraktionierten Tumorextraktes wurden noch zwei Gelfiltrationsschritte (Sepharose 6B, Sephadex G 100) eingefügt und entsprechend der Trenncharakteristik der Säulentypen folgendermaßen hintereinandergeschaltet (Abb. 9):

Sepharose 6B (die Entscheidung fiel für Sepharose 6B auf Grund einer gegenüber Sepharose 4B differenzierteren Auftrennung höhermolekularer Proteine) - Sephadex G 200 - Sephadex G 100.

Der Reinigungsschritt auf Sepharose 6B lieferte einen gut abgegrenzten ersten Peak (Fraktion I), der Rest wurde als Sammelfraktion eingeengt und auf Sephadex G 200 rechromatographiert. Hieraus resultierten zwei voneinander deutlich abgesetzte Fraktionen (Fraktion II und III), während sich die Proteinfraktionen mit einem Molekulargewicht unter 100 000 d durch abschlie-

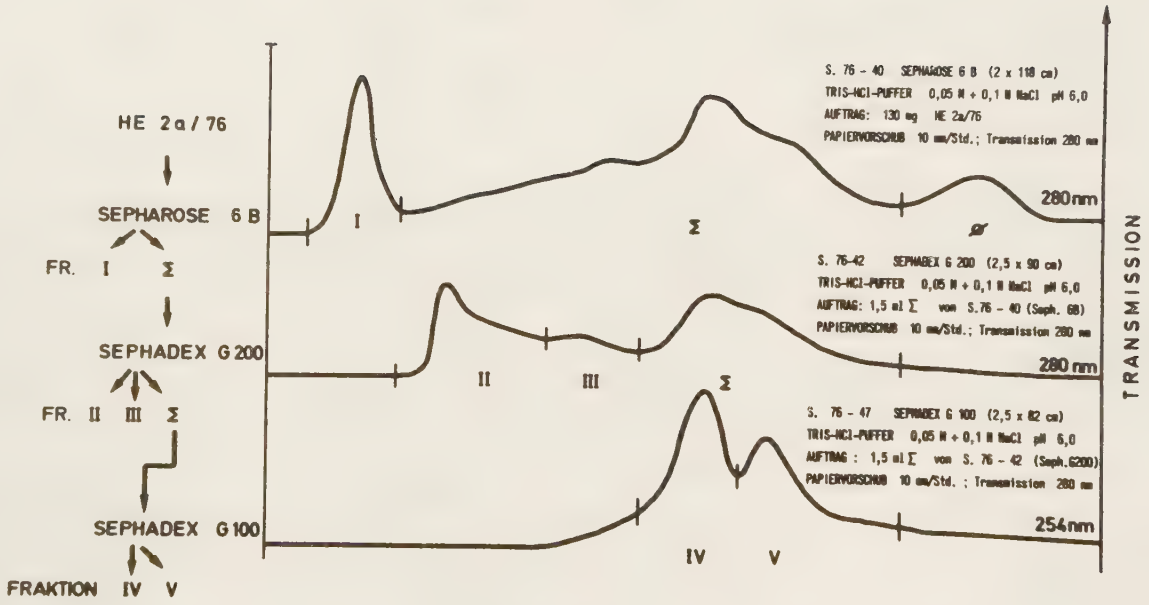


Abbildung 9

Schema der Fraktionierung von salinem Hypernephromextrakt (HE 2a/76) mittels Gelfiltrations-Chromatographie. Die Sammelfraktionen (Σ) wurden auf der jeweils nachgeschalteten Säule re-chromatographiert.

Gende Filtration mittels Sephadex G 100 noch weiter auftrennen ließen (Fraktion IV und V). Diese fünf Fraktionen wurden ebenso wie die saline und die Perchlorsäure-Gewebspräparation zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

2.3.3.1.3 Immunadsorption

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie mit an CNBr.-aktivierte Sepharose 4B angekoppeltem spezifischem Antikörper vom Kaninchen durchgeführt. Die hierzu verwandten Antiseren stammten zu Beginn von Tieren, die mit Gesamtextrakt (HE 7/75, HE 2a/76, HE 2b/76) oder mit säulenchromatographisch vorfraktioniertem Hypernephromextrakt immunisiert worden waren und deren Immunglobulinpräparation nach ausgiebiger Absorption mit Normalserum, A/B-Erythrozyten und in einem Teil der Fälle mit Normalgewebsproteinen sowie nach DEAE-Zellulose-Chromatographie im OUCHTERLONY-Test noch ausreichende Reaktionen erkennen ließen (s. später). Das in diesem Schritt vorgereinigte Material lieferte durch erneute Immunisierung Antikörper, die dann wiederum für eine CNBr.-aktivierte Sepharose 4B zur Verfügung standen.
Die in Abbildung 10 wiedergegebene Kurve soll das Prinzip einer Auftrennung von Extraktproteinen mittels Affinitätschromatographie verdeutlichen: in Fraktion I werden die von der Säule nicht gebundenen Serumeiweiße und andere Verunreinigungen sofort mit dem Startpuffer eluiert. Spezifisch gebundenes Material wird erst nach Pufferwechsel im Anschluß an eine Zwischenphase (Fraktion II) mit dem Endpuffer freigegeben (Fraktion III).
Wegen der guten Erfahrungen in diesem Arbeitslabor mit der Isolierung von CEA und AFP, die auch aus der Literatur bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit bei den ersten Immunadsorptions-Säulen ebenfalls versucht, die spezifisch gebundene Fraktion durch pH-Wechsel zu eluieren. Nachdem jedoch unter Anwendung desselben Systems spezifisches Material, das bei vorheriger Prüfung im Extrakt vorhanden war, meistens in der III. Fraktion mittels OUCHTERLONY-Testung nicht mehr nachgewiesen werden konnte, mußte eine Zerstörung oder Veränderung dieser

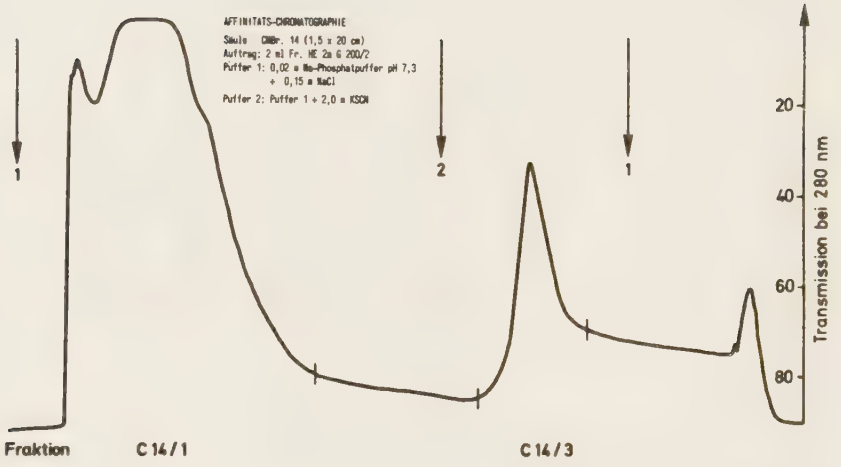


Abbildung 10

Säulenchromatogramm einer Affinitätschromatographie (CNBr.-aktivierte Sepharose 4B mit fixiertem Anti-Ferritin-IgG vom Kaninchen) eines gelfiltrierten (Sephadex G 200/II = Fraktion II) Hypernephromextraktes (HE 2a/76). Elution der Antikörper-gebundenen Fraktion III durch Änderung der Puffer-Ionenstärke (PBS - PBS + 2 M KSCN).

Proteine durch die Säureeinwirkung angenommen werden. Deswegen wurde der bisherige Endpuffer (pH 2,8) durch einen fast pH-neutralen (pH 7,3) Puffer höherer Ionenstärke (2 M Kaliumthiocyanat) ersetzt.

In der Regel enthielt die aus diesem Schritt resultierende Fraktion III noch nicht vernachlässigbare Mengen an Serumproteinen, überwiegend Albumin (unspezifische Bindung von Albumin an CNBr.-aktivierte Sepharose 4B). Eine Abtrennung dieser Verunreinigung gelang jedoch weitgehend durch Rechromatographie des Materials auf einer CNBr.-aktivierten Sepharose 4B mit angekoppeltem Anti-Albumin-Antikörper vom Kaninchen, wobei nun die I. Fraktion verwandt und die III. Fraktion (= Albumin) verworfen wurde (s. später).

2.3.3.1.4 Antiseren

Mit Extrakten aus Hypernephrom- und in einem Fall (Nr. 3) aus normalem Nierengewebe wurden insgesamt 19 Kaninchen immunisiert (Tabelle 8). Zur Anwendung als Antigenpräparationen gelangten saliner (Nr. 1, 2, 4, 7, 8) und Perchlorsäure- (Nr. 6, 9, 18) Gesamtextrakt, desweiteren auf Sephadex G 200 alleine (Nr. 5) bzw. nach dem Schema der Tabelle 7 und Abbildung 9 gelchromatographisch vorfraktionierter (Nr. 12 - 16) sowie abschließend auf CNBr.-aktivierter Sepharose 4B mit fixiertem Antikörper gereinigter (Nr. 10, 11, 17, 19) saliner Hypernephromextrakt. Nach Beendigung des unter Methodik beschriebenen Immunisierungsschemas wurde den Hasen eine Woche später Blut abgenommen und dessen Gehalt an Antikörpern gegen Tumor- und Normalgewebsproteinen nach Absorption mit lyophilisiertem Normalserum überprüft. Hierbei erwiesen sich von den Tabelle 8 aufgeführten Antiseren fünf als sehr schlecht oder gar nicht reaktiv und wurden deswegen nicht weiterverarbeitet, während sieben Hasen eine mäßige, aber brauchbare, und sieben eine gute Antikörperbildung zeigten.
Sodann wurden die Seren gewonnen und im OUCHTERLONY-Test mit einer Absorptionsreihe die zur Vollabsorption der Verunreinigungen benötigten Mengen der jeweiligen Extrakte (Lyophilisat von Normalserum und normalem Nierengewebsextrakt) ermittelt. Abbildung 14 gibt ein typisches Beispiel dieser Untersuchung wieder. Die Seren Nr. 1 - 3, 13 und 17 mußten darüberhinaus mit gewaschenen Erythrozytenkonzentraten der Blutgruppe AB und 0 absorbiert werden, bis mikroskopisch keine Agglutination mehr feststellbar war.
Erst nach vollständig abgeschlossener Absorptionsprozedur wurde das zuvor gegen Startpuffer (Na-Phosphatpuffer 0,01 M, pH 8,0) dialysierte Antiserum auf DEAE-Zellulose aufgetragen (Chromatogramm s. Abb. 11) und der Gradient nach Elution des I. Hauptpeaks (Fraktion I) sowie eines zu Fraktion II zusammengefaßten flachen Niveaus angeschlossen. Wie die CAF-elektrophoretische (Abb. 12) und die immunelektrophoretische (Abb. 13) Untersuchung zeigt, handelt es sich bei diesen beiden Fraktionen um reine IgG-Präparationen, während die III. Frak-

Tabelle 8

ÜBERSICHT ÜBER EIGENE ANTI-HYPERNEPHROMEXTRAKT-SEREN VOM KANINCHEN

Antiserum (AS) Nr.	Name (DEAE-Zell.)	Immunisierungs-substanz	Absorption	Beurteilung
1	Edgar	HE 7/75	1 mg NS/ml AS 1 mg NNE/ml AS 3 ml Ery/ml AS	mäßiges AS
2	Dominique (S. 75-86)	HE 7/75	1 mg NS/ml AS 1 mg NNE/ml AS 3 ml Ery/ml AS	mäßiges AS
3	Zenzy (S. 75-98)	NNE 7/75	1 mg NS/ml AS 1 mg HE/ml AS 3 ml Ery/ml AS	gutes AS
4	Affi (S. 76-5)	HE 7/75	1 mg NS/ml AS	mäßiges AS
5	Lissy	HE 7/75 S. G 200/I-IV	1 mg NS/ml AS 1 mg NNE/ml AS	ø
6	Sepp (S. 76-54)	HE 2b/76	1 mg NS/ml AS	mäßiges AS
7 8	Monique und Zizzy (S. 76-37)	HE 2a/76	1 mg NS/ml AS	gutes AS
9	Roland (S. 77-17/23)	HE 2b/76	1 mg NS/ml AS 3 ml Ery/ml AS	gutes AS
10	Roman (S. 76-59)	HE 2a/76, CNBr Mon.-Zizzy/III	1 mg NS/ml AS	gutes AS
11	Emmi (S. 76-60)	s. "Roman"	1 mg NS/ml AS	mäßiges AS
12	Laurent	HE 2a/76 Sepharose 6B/I		ø
13	Carmen (S. 77-16)	HE 2a/76 Seph. G 200/II	1 mg NS/ml AS 3 ml Ery/ml AS	gutes AS
14	Jimmy	HE 2a/76 Seph. G 200/III	1 mg NS/ml AS	ø
15	Leonid	HE 2a/76 Seph. G 100/IV	1 mg NS/ml AS	ø
16	Ika	HE 2a/76 Seph. G 100/V		ø
17	Boris (DEAE-Zell.)	HE 2a/76 Seph. G 200/II CNBr Carmen/III	1 mg NS/ml AS 3 ml Ery/ml AS	mäßiges AS
18	Nr. 25	HE 2b/76		mäßiges AS
19	Nr. 29 (DEAE-Zell.)	HE 2a/76, Fr.II CNBr-Nr. 14/III	1 mg NS/ml AS 3 ml Ery/ml AS	gutes AS

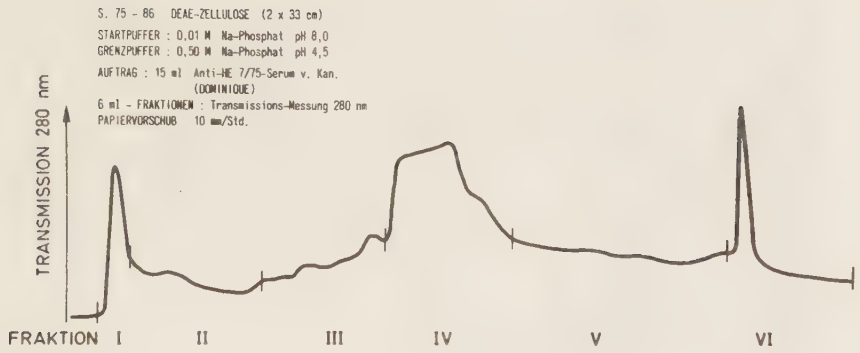


Abbildung 11

Säulenchromatogramm der DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher-Chromatographie eines Anti-HE 7/75-Serums vom Kaninchen (Dominique). Beginn der kontinuierlichen Gradientenelution vor Erscheinen der III. Fraktion

tion bereits geringe Beimengungen von Transferrin und die folgenden Fraktionen (IV - VI) zunehmend die übrigen Serumproteine enthalten. Nur die erste Fraktion diente als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie mittels CNBr.-aktivierter Sepharose 4B.

2.3.3.1.5 Partielle Reinigung von Tumor-assoziierten Proteinen

2.3.3.1.5.1 Mit Ferritin kreuzreagierendes Antigen

Mittels eines eigenen NS-absorbierten Antiserums, hergestellt durch Immunisierung eines Hasen (Carmen, Nr. 13) mit Fraktion II des chromatographierten HE 2a/76 (s. Abb. 9 und Tab. 7), wurde in salinem Hypernephrom- (HE 2a/76) und in etwas geringerer Konzentration in normalem Nierengewebsextrakt (NNE 3/76) eine Substanz gefunden, die in der Perchlorsäurepräparation nicht nachweisbar ist (Abb. 15) und im vergleichenden Ansatz gegen dieses Serum zusammen mit einem kommerziellen Referenz-Anti-Ferritin-Serum (Abb. 16 a und b) als ein mit Ferritin

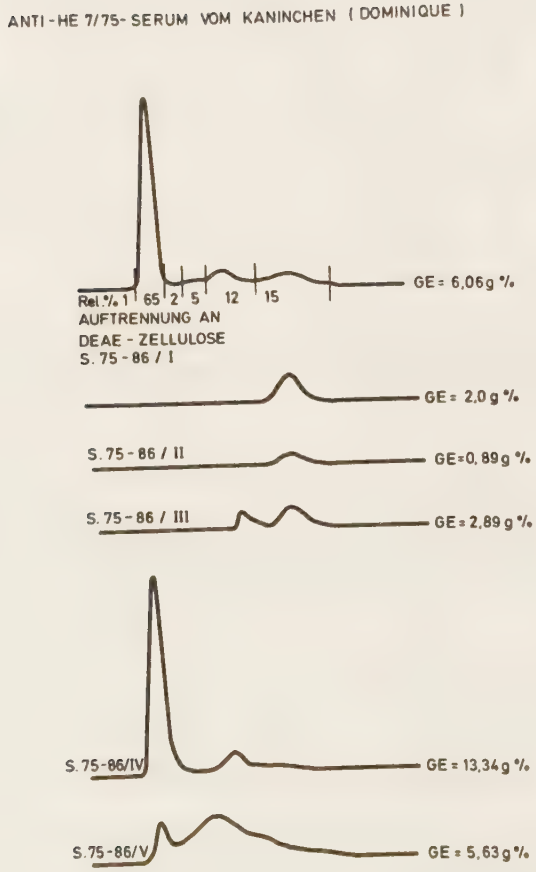


Abbildung 12

CAF-elektrophoretische Untersuchung der ersten fünf Fraktionen eines mittels DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher chromatographierten Anti-HE 7/75-Serums vom Kaninchen (Dominique).

Abbildung 13

Immunelektrophoretische Untersuchung der ersten fünf Fraktionen eines mittels DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher chromatographierten Anti-HE 7/75-Serums vom Kaninchen (Dominique) im Ansatz gegen polyvalentes Anti-Kaninchen-Serum.

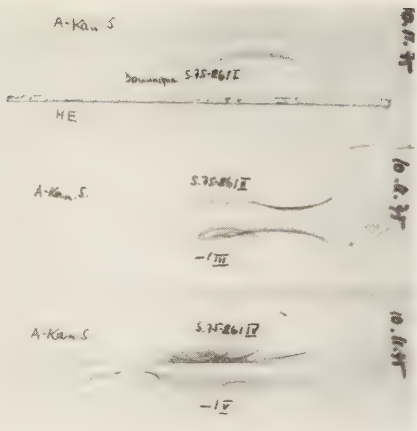
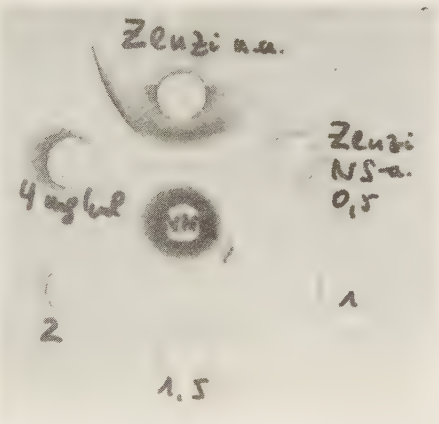


Abbildung 14

OUCHTERLONY-Untersuchung der Absorptionsreihe eines Antiserums vom Kaninchen (in diesem Fall Anti-NNE 7/75-Zenzy) im Ansatz gegen NNE 7/75 (Beispiel). Absorption mit lyophilisiertem Normalserum (NS)



kreuzreagierendes Antigen identifiziert werden konnte. Nach gelchromatographischer Fraktionierung von HE 2a/76 läßt es sich in Fraktion II (s. Abb. 9 und Tab. 7) lokalisieren (Abb. 17 a und b). Seine partielle Isolierung durch Auftrennung dieser Fraktion des filtrierten HE 2a/76 auf CNBr.-aktivierter Sepharose 4B mit angekoppeltem gereinigtem Antikörper gelang erst, nachdem die Elution der spezifischen (III.) Fraktion nicht mehr durch pH-Wechsel, sondern durch Änderung der Ionenstärke vorgenommen wurde. Als Ausgangsmaterial hierfür diente

Abbildung 15

OUCHTERLONY-Untersuchung der Extrakte HE 2a/76, HE 2b/76 und NNE 3/76 sowie von Normalserum (NS) im Ansatz gegen ein eigenes Anti-HE 2a/76-Serum vom Kaninchen (Carmen).
NS a = NS-absorbiert.
Erklärung s. Text.

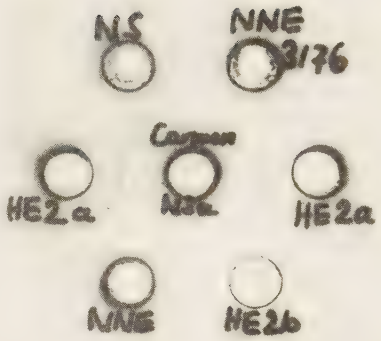


Abbildung 16a

OUCHTERLONY-Untersuchung der Extrakte HE 2a/76, HE 2b/76 und NNE 3/76 im Ansatz gegen zwei eigene Antiseren vom Kaninchen (Carmen, Nr. 29) sowie gegen ein kommerzielles Referenz-Anti-Ferritin- und ein kommerzielles Referenz-Anti-Lactoferrin-Serum.
Erklärung s. Text.

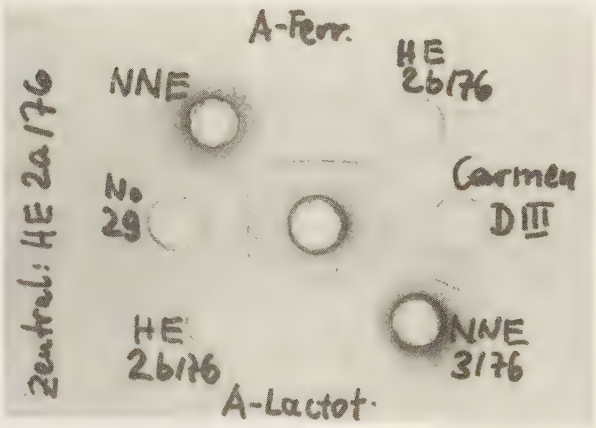
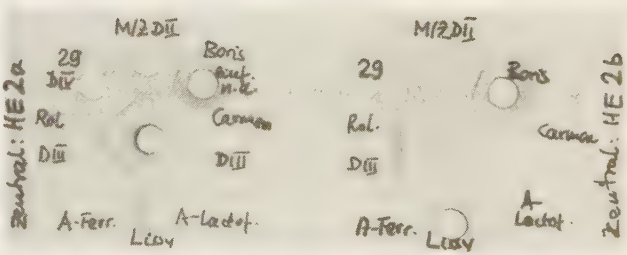


Abbildung 16b

OUCHTERLONY-Untersuchung der Extrakte HE 2a/76 und HE 2b/76 im Ansatz gegen die eigenen Antiseren Carmen, Nr. 29, Monique/Zizzy (M/Z), Roland, Lissy und Boris sowie gegen die kommerziellen Referenz-Seren Anti-Ferritin (A-Ferr.) und Anti-Lactoferrin (A-Lactof.).
Erklärung s. Text und Abschnitt 2.3.4.1.4.1 "Ferritin in Tumorzellen".



Abbildungen 17a und b

OUCHTERLONY-Untersuchung des salinen Gesamtextraktes (HE 2a/76) und der fünf Einzelfraktionen des mittels Gelfiltrations-Chromatographie aufgetrennten HE 2a/76 im Ansatz gegen ein eigenes Anti-HE 2a/76-Serum vom Kaninchen (Abb. 17a) sowie gegen ein kommerzielles Referenz-Anti-Ferritin-Serum (Abb. 17b).

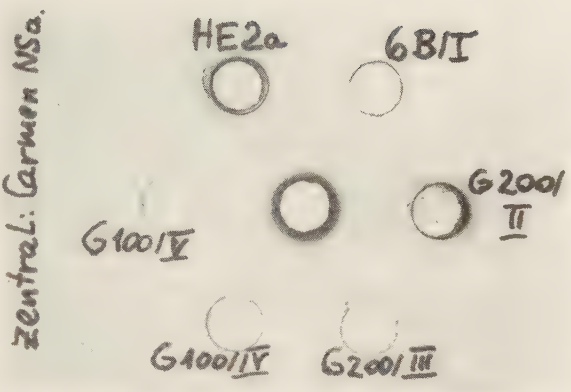


Abb. 17a

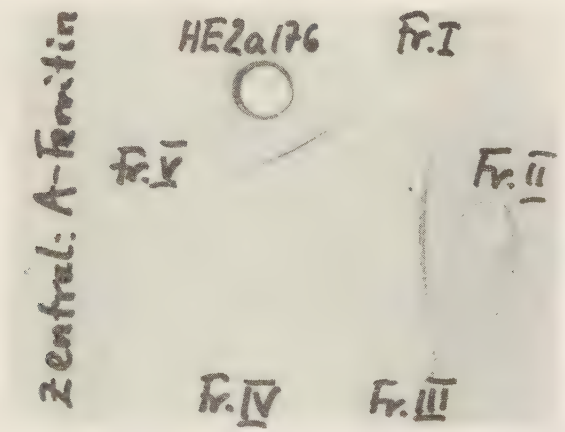
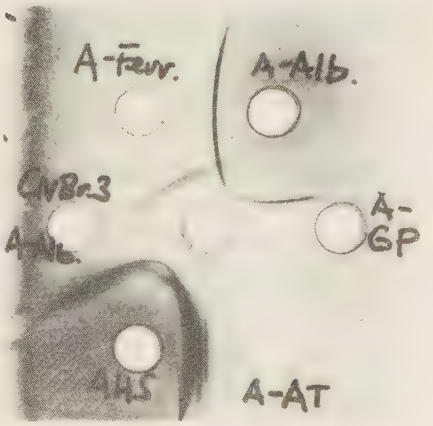


Abb. 17b

Abbildung 18

OUCHTERLONY-Untersuchung des durch vier aufeinanderfolgende Chromatographieschritte (Sepharose 6B, S. G 200, CNBr.-aktivierte Sepharose 4B-Nr. 14 und Anti-Albumin-CNBr.-akt. Seph. 4B) gereinigten HE 2a/76 im Ansatz gegen ein polyvalentes Anti-Human-Serum (AHS) und verschiedene Anti-Humanprotein-Seren vom Kaninchen. Zentrales Reservoir: HE 2a/76, Fraktion II - CNBr.-Nr. 14/III - Anti-Albumin-CNBr./I. Abkürzungen s. Abb. 3 und 16b.



neben Carmen das Antiserum Nr. 14 aus der Produktion des Arbeitslabors (Immunisierungssubstanz: 3 M KCl-Extrakt aus Lungenkarzinomgewebe) mit einem starken Anti-Ferritin- und zusätzlich einem geringen Anti-Lactoferrin-Antikörper-Titer (s. unten), das noch deutlichere Reaktionen gegenüber der kreuzreagierenden Substanz in HE zeigte als Carmen. In der Antigen-haltigen Fraktion (III) finden sich noch Verunreinigungen mit Serumproteinen, vorwiegend Albumin, das sich durch Rechromatographie auf CNBr.-aktivierter Sepharose 4B mit fixiertem Anti-Albumin-Antikörper entfernen ließ (Abb. 18).
Durch Immunisierung eines Hasen (Nr. 29) mit diesem vorgereinigten Material ließen sich in dessen Serum noch höhere Antikörper-Titer gegen das Antigen induzieren (Abb. 16), wobei jedoch auch hier ebenso wie bei Carmen und Nr. 14 Anti-Lactoferrin-Antikörper (s. unten) nachweisbar waren.
Von den übrigen Antiseren der Tabelle 8 zeigten noch "Monique" und "Zizzy" eine nennenswerte, wenn auch schwächere Reaktion mit dieser Substanz sowie, andeutungsweise, "Lissy" (Abb. 19).

2.3.3.1.5.2 Mit Lactoferrin kreuzreagierendes Antigen

Ein mit Lactoferrin kreuzreagierendes Antigen ließ sich mittels eines kommerziellen Referenz-Anti-Lactoferrin-Serums im salinen Hypernephromextrakt (HE 2a/76), jedoch weder in der Perchlorsäure- noch in der Normalgewebspräparation nachweisen (Abb. 16). Seine Anreicherung gelang in Fraktion II des gelchromatographierten HE 2a/76 (Abb. 20), in anderen Fraktionen fand es sich nicht. Wie bereits angedeutet, war es auch Bestandteil der Fraktion III des auf CNBr.-aktivierter Sepharose 4B (Nr. 14) aufgetrennten HE 2a/76 (Fraktion II), was auf einen Antikörper-Gehalt des dazu verwandten Antiserums (Nr. 14) auch gegenüber diesem kreuzreagierenden Antigen hinweist und den Anti-Lactoferrin-Antikörper-Titer des Serums Nr. 29 erklärt.
Die Antiseren "Carmen", "Monique" und "Zizzy" (Abb. 16 und 19) wiesen ebenfalls solche Antikörper auf, desgleichen, wenn auch nur andeutungsweise, das Serum "Lissy".

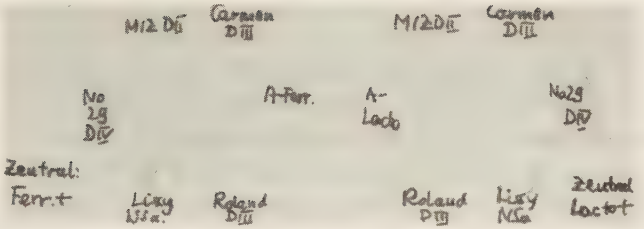
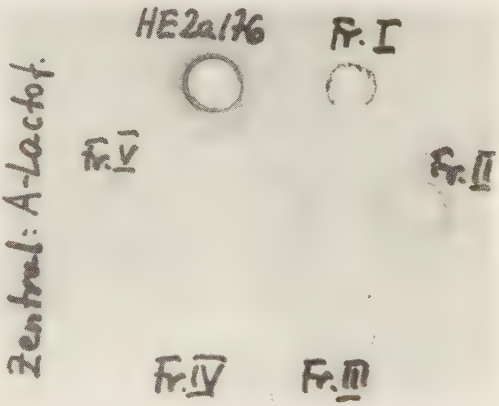


Abbildung 19

OUCHTERLONY-Untersuchung der Anti-HE 2a/76-Antiseren Monique/Zizzy (M/Z D II), Carmen, Nr. 29 und Lissy, des Anti-HE 2b/76-Serums Roland sowie der kommerziellen Referenz-Seren Anti-Ferritin (A-Ferr.) und Anti-Lactoferrin (A-Lact.) im Ansatz gegen eine Ferritin-positive (Ferr +) und eine Lactoferrin-positive (Lacto +) Fraktion.

Abbildung 20

OUCHTERLONY-Untersuchung des salinen Gesamtextraktes und der fünf Einzelfraktionen des mittels Gelfiltrations-Chromatographie aufgetrennten HE 2a/76 im Ansatz gegen ein kommerzielles Referenz-Anti-Lactoferrin-Serum.



2.3.3.1.5.3 Weiteres, nicht näher charakterisiertes Protein

Ein nicht näher identifiziertes Protein, das sowohl im salinen als auch im Perchlorsäure-Hypernephromextrakt und im normalen Nierenextrakt vorkommt, stellt sich in der OUCHTERLONY-Untersuchung des eigenen Anti-HE 2b/76-Serums "Roland" dar (Abb. 21). Hierbei kann es sich weder um ein Serumprotein (das Antiserum wurde mit Normalserum absorbiert, bis im Ansatz dagegen keine Reaktion mehr zu erkennen war) noch um einen der bekannten ge-

testeten Tumormarker handeln, die z.T. nicht Bestandteil von HE 2b/76 (der Immunisierungssubstanz) sind (s. früher) bzw. im Falle des Ferritin, Lactoferrin und Alpha$_1$-Antichymotrypsin wegen des Verlaufes der Präzipitationslinie in Abbildung 21 nicht in Frage kommen. Die große Entfernung dieser Linie vom Antigen-Reservoir sowie ihre Unschärfe deuten auf ein relativ kleines Molekulargewicht dieses Proteins hin. Die Bestätigung hierfür lieferte die gelchromtographische Auftrennung des Extraktes, nach der es in Fraktion V mit einem Molekulargewicht um 60 000 d lokalisiert werden konnte.

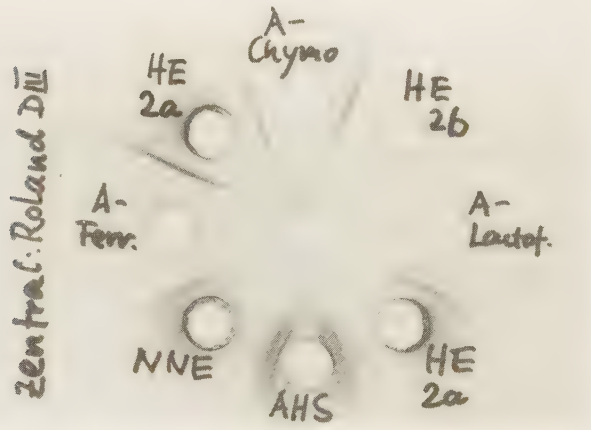


Abbildung 21

OUCHTERLONY-Untersuchung eines eigenen Anti-HE 2b/76-Serums vom Kaninchen (Roland), der kommerziellen Referenz-Seren Anti-Ferritin, Anti-Lactoferrin und Anti-Alpha$_1$-Antichymotrypsin und eines Anti-Human-Serums vom Kaninchen im Ansatz gegen HE 2a/76, HE 2b/76 und NNE 3/76.

2.3.3.1.6 Radioimmunoassays

CEA-RIA

Die CEA-Bestimmung der untersuchten Patienten-Seren wurde in insgesamt 30 Kits durchgeführt. Der Assay wies eine mittlere Empfindlichkeitsgrenze von 2 ng/ml auf, sein Meßbereich lag zwischen 2 und 80 ng/ml. Als Intra-Assay-Variation wurde bei 20 Bestimmungen ein Wert von<5% (Variationskoeffizient) gefunden. Die Inter-Assay-Variation lag zwischen 11,7% ($\bar{x}$ = 62,7 $\pm$ 7,3 ng/ml; N = 115) und 16,7% ($\bar{x}$ = 7,1 $\pm$ 1,2 ng/ml; N = 103).

AFP-RIA

Die Bestimmung der AFP-Serumkonzentrationen wurde ebenfalls in 30 Kits vorgenommen. Bei einer mittleren Empfindlichkeit von 2,5 ng/ml erstreckte sich der Meßbereich des Assays von 2,5 bis 200 ng/ml. Die Intra-Assay-Variation lag unter 5%, die Inter-Assay-Variation zwischen 13% ($\bar{x}$ = 140,6 $\pm$ 18,3 ng/ml; N = 95) und 7,9% ($\bar{x}$ = 35,4 $\pm$ 2,8 ng/ml; N = 103).

2.3.3.2 KLINISCHER TEIL

2.3.3.2.1 CEA-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom

Normalwerte

Die bei 60 jugendlichen männlichen Probanden gefundenen CEA-Spiegel lagen im Mittel bei 1,4 $\pm$ 0,7 ng/ml und sämtliche unter 3 ng/ml.

Werte bei Nierenkarzinomkranken

Die Tabellen 9 und 10 geben eine Aufstellung der CEA-Serumspiegel von jenen 90 Nierenkarzinom-Patienten wieder, über die klinische Angaben zu erhalten waren, in Tabelle 11 sind alle CEA-Befunde unter Berücksichtigung des Erkrankungsstadiums sowie der Einzelbestimmungen und Verläufe nach dem Kriterium des Untersuchungszeitpunktes ("Vor Behandlung" sowie "Nach bzw. unter Behandlung") zusammengefaßt. Hierbei verteilten sich die ermittelten Werte über folgende Bereiche: $\leq$ 3 ng/ml (normal), 3,1 - 5 ng/ml (gering erhöht) und 5,1 - 15 ng/ml (mäßig erhöht).

Von 14 Einzelbestimmungen vor Behandlungsbeginn lagen 11 im normalen und 3 im mäßig erhöhten Bereich, von den 8 postoperativen Einzelbestimmungen ("Nach bzw. unter Behandlung") waren alle unter 3 ng/ml. Wenn sich auch nach Aufgliederung in die einzelnen Erkrankungsstadien allein schon wegen der zu geringen Fallzahl kein statistisch zu sicherndes unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die CEA-Konzentrationen ergab, so entfallen die mit 6,5 ng/ml, 13 ng/ml und 15 ng/ml mäßig erhöhten prätherapeutischen CEA-Werte doch nur auf die Stadien $T_{2-3}N_0M_0$ (großer Primärtumor mit partieller Infiltration des Kapselgewebes) und $T_4N_{1-4}M_{1/X}$ (inoperabel). Bei einem Patienten (15 ng/ml) war darüberhinaus eine massive Metastasierung in die Leber bekannt.

Bei den 28 Verlaufsbestimmungen war vor Behandlungsbeginn in

Tabelle 9

CEA-, AFP- UND FERRITIN-SPIEGEL IM SERUM VON NIERENKARZINOM-PATIENTEN

A) Untersuchung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Ferr. = Ferritin; no. = normal (CEA-Spiegel ≦ 3 ng/ml, AFP-Spiegel ≦ 15 ng/ml); Ther. = Therapie: O = Operation, R = Bestrahlung, C = Cytostatische und H = Hormonelle Therapie; LU = Lungenmetastasen; LE = Lebermetastasen; KN = Knochenmetastasen; HI = Gehirnmetastasen; DÜ = Dünndarmmetastasen; LK = Lymphknotenmetastasen (juxtaregional); MM = Multiple Metastasierung; prä/post = prä- und postoperative Werte.

Patient Nr.	Alter (Jahre)/ Geschl.	Tumor - stadium T	N	M	Labor - parameter BSG	Hb	Ther.	Serum - Spiegel (ng/ml) CEA	AFP	Ferr.	Zeitpunkt
1	64/m	3	0	0	54/85	13,5	R+O	4	no.	1012	präop.
								8	no.		postop.
2	21/w	3	1	0	16/41	8,8	R+O	no.	no.		postop.
3	42/m	4	X	1(MM)	110/137	10,2	R+H	no.	no.		
								4,8	no.		
4	76/m	2	0	0	20/44	10,6	O	no.	no.	97	präop.
								no.	no.	450	postop.
5	38/w	3	0	0	12/35	12,7	R+O	no.	no.		
6	48/m	3	0	0	104/119	11,6	O	no.	no.	2937	präop.
								4	no.	1711	postop.
7	59/m	3	0	0	9/18	16,0	R+O	no.	no.	438	präop.
								no.	no.	878	postop.
8	73/m	3-4	2	1(LU)	21/39	13,3	O		no.		präop.
9	66/w	3	0	0		7,8	O	6,5			präop.
10	61/m	1	0	0	21/44	15,5	R+O	no.	no.		prä/post
11	76/m	4	1	0	94/105	12,9	Inop.	no.	no.		prä/post
12	51/w	3	1	0	14/30	12,6	R+O	no.	no.	473	präop.
								no.	no.	235	postop.
13	65/m	3	1	0	104/135	9,9	R+O	no.	no.		prä/post
14	53/w	3	0	0	47/69	10,9	R+O	no.	no.	45	präop.
								no.	no.	775	postop.
15	47/w	3	0	0			O	no.	30	359	präop.
16	39/m	1	0	0	60/97	13,9	R+O	no.	no.	485	präop.
								no.	no.	4215	postop.
17	56/w	3	0	0	105/134	10,7	R+O	no.	no.		prä/post
18	73/w	2	0	0	56/94	10,1	R+O	no.	no.	22	präop.
								no.	no.		postop.
19	64/m	3	0	0			R+O	no.	no.	325	präop.
20	51/w	2	0	1(LU)	110/138	12,8	R+O+H	no.	no.		prä/post

Tabelle 9 (Fortsetzung)

Patient Nr.	Alter (Jahre) Geschl.	Tumor - stadium T	N	M	Labor - parameter BSG	Hb	Ther.	Serum - Spiegel (ng/ml) CEA	AFP	Ferr.	Zeitpunkt
21	62/w	3	0	1(LU)	54/88	11,5	R+0	no.	no.	914	präop.
								no.	no.		postop.
22	70/m	3	0	0			R+0	no.	no.	687	präop.
								no.	no.	1037	postop.
23	49/m	1-2	0	0	5/12	12,0	R+0	no.	no.	281	präop.
								no.	no.		postop.
24	74/m	3	0	1(LU)	1/2	18,7	R+0		no.		postop.
25	62/m	2	0	0	7/18	15,2	R+0	no.	no.	135	präop.
								no.	no.	206	postop.
26	61/w	4	3	0	80/128	7,6	R(Inop)	no.	no.	817	
27	68/m	X	X	1(MM)	53/110	9,2	Inop.	15	no.		
28	63/m	2	0	0	30/50	12,0	R+0	no.	no.	599	präop.
								no.	no.	623	postop.
29	64/m	3	1	1(MM)	79/105	10,6	H	no.	no.		
30	64/m	3	0	1(KN)	88/100	9,7	0		no.		postop.
31	61/m	1	0	0	71/85	12,4	0	no.	no.	237	präop.
								no.	no.	534	postop.
32	54/w	2	0	1(LU)	90/130	10,9	0+H	no.	no.		postop.
33	66/m	3	0	0	14/36	14,6	R+0	no.	no.	311	präop.
								no.	no.	540	postop.
34	54/m	3	0	0	129/132	10,4	R+0	no.	no.	533	präop.
								no.	no.	938	postop.
35	51/m	4	X	1(MM)	105/140	11,6	C	no.	no.		
36	57/m	2-3	0	0	6/19	16,0	R+0	no.	no.		prä/post
37	46/w	3	0	1(LU)	43/85	11,2	0		no.	75	präop.
								no.	no.		postop.
38	66/m	2	0	0	68/105	10,4	R+0	9	no.	407	präop.
								6	no.	899	postop.
39	57/m	4	1	1(MM)	40/69	13,0	H	no.	no.	465	
40	39/m	2-3	0	0	70/113	12,1	R+0	no.	no.		postop.
41	51/m	2-3	0	0	45/75	13,2	R+0	no.	no.	462	präop.
								4,2	no.	479	postop.
42	61/w	2	1	0	62/86	8,4	R+0	no.	no.		postop.
43	39/m	3	0	0	110/113	13,0	0	no.	no.		postop.
44	59/m	2-3	0	0	13/30	15,1	R+0	no.	no.	181	präop.
								no.	no.	503	postop.

Tabelle 9 (Fortsetzung)

Patient Nr.	Alter (Jahre) Geschl.	Tumor - stadium T	N	M	Labor - parameter BSG	Hb	Ther.	Serum - Spiegel (ng/ml) CEA	AFP	Ferr.	Zeitpunkt
45	52/w	X	X	1(MM)		13,1	Inop.	no.	no.	93	
46	71/m	4	X	1(LE)	45/81	13,5	R+O	no. no.	no. no.	1050 1208	präop. postop.
47	67/m	1	O	O		11,4	O	no.	no.		präop.
48	55/m	3	O	O	30/62	13,7	R+O	no.			präop.
49	66/m	2	O	O	32/58	14,4	O	no.	no.	1192	präop.
50	59/m	2-3	3	1(LE)	69/103	11,9	O+H	no.	no.		postop.
51	55/m	3	2	O		15,1	O+R	no.			postop.
52	70/m	3	O	O	12/37	15,2	R+O	13	no.		präop.
53	67/w	1	O	O	13/30	12,7	R+O	no.	no.	478	präop.
54	74/m	X	X	1(MM)	34/63 45/80	12,9	Inop. H	3,8 4,0	no. no.		
55	76/m	2	O	O	125/141	13,0	R+O	no.	no.	1976	präop.

zwei Fällen eine geringe (4 und 3,8 ng/ml) und in einem Fall eine mäßige Erhöhung (9 ng/ml) der CEA-Konzentration zu erheben, wobei hiervon ebenfalls nur Kranke der Stadien $T_{2-3}N_0M_0$ bzw. $T_4N_{1-4}M_{1/X}$ betroffen waren, ohne daß dieses Ergebnis statistisch auswertbar wäre (zu geringe Fallzahl). Die Abschlußkontrollen 2 bis 3 Wochen nach Operation bzw. Therapiebeginn lassen dann eine gewisse Fluktuation erkennen: in der Gruppe $T_{2-3}N_0M_0$ war postoperativ bei einem Patienten ein leichter Anstieg des CEA-Spiegels von 4 auf 8 ng/ml und bei zwei weiteren ein minimaler Anstieg von unter 3 ng/ml auf 4 sowie 4,2 ng/ml zu verzeichnen, während es bei dem Kranken mit dem mäßig erhöhten Wert zu einem Abfall von 9 auf 6 ng/ml kam. In der Gruppe der Inoperablen fand sich neben dem über einen Zeitraum von vier Wochen unverändert gering erhöhten CEA-Spiegel ein zusätzlicher Anstieg von unter 3 auf 4,8 ng/ml, so daß nun vier CEA-Titer über dem prätherapeutischen Ausgangswert lagen und somit von den 28 Abschlußkontrollen 4 Patienten gering und 2 Patienten mäßig erhöhte CEA-Serumkonzentrationen aufwiesen.

Tabelle 10

CEA-, AFP- UND FERRITIN-SPIEGEL IM SERUM VON NIERENKARZINOM-PATIENTEN

B) Untersuchung von Patienten, deren operative Behandlung mindestens sechs Monate zurücklag. Rez. = Rezidiv bzw. Metastasen. Sonstige Abkürzungen s. Tabelle 9.

Patient Nr.	Alter (Jahre) Geschl.	Rez.	Labor - parameter BSG	Hb	Ther.	Serum - Spiegel (ng/ml) CEA	AFP	Ferr.	Bemerkung
1	67/w	ø	9/30	14,1	ø	no.	no.	206	
2	48/m	+(MM)	65/97	14,9	ø	no.	no.		LU, LE
3	49/m	+(LU)			H	no.	no.	942	
4	74/w	+(KN)	113/135	13,3	R	4,7	no.	217	Cholezystitis
5	72/m	+(LU)	8/25	14,7	ø	4	no.	438	
6	62/m	+(MM)	145/148	8,2	H	3,7	no.		LU, HI
7	42/m	+(MM)	87/116	11,8	O, ø	no.	37	1579	LE
8	66/w	ø	14/31	14,1	ø	no.	no.	105	
9	49/m	+(MM)	44/77	11,0	ø	no.	no.	1217	
10	66/m	ø	9/23	13,2	ø	no.	no.	937	
11	61/m	+	23/61		O, ø	no.	no.		Schilddrüse
12	28/m	+(KN)				no.	no.	705	
13	47/m	ø	5/10	15,6	ø	no.	no.		
14	52/w	ø	80/132	9,6	ø	no.	no.	185	Niereninsuffizienz
15	54/w	ø	11/36	14,8	ø	no.	no.	121	
16	57/m	ø	8/22	13,7	ø	no.	no.		
17	48/m	ø	3/10	14,9	ø	no.			
18	66/m	+(MM)	108/137	9,1	ø	no.	no.		
19	25/m	+(LK)	34/68	11,4	ø	no.	no.	225	Mediastinale LK
20	74/m	+(MM)	0/2	19,7	ø	no.	no.	811	LU, KN
21	49/m	+(KN)	26/45	14,7	H	no.	no.	189	
22	64/m	+(MM)	135/145	11,4	H	no.	no.	983 1235	Kontrolle nach 3 Mon.
23	51/m	ø		13,2	ø	no.	no.		
24	38/w	ø	7/16	12,7	ø	no.	no.	61	

Tabelle 10 (Fortsetzung)

Patient Nr.	Alter (Jahre) Geschl.	Rez.	Labor - parameter BSG	Hb	Ther.	Serum - Spiegel (ng/ml) CEA	AFP	Ferr.	Bemerkung
25	63/w	ø	17/44		ø	no.	no.	277	
26	56/w	ø	15/30	15,1	ø	no.	no.		
27	42/m	ø	15/37	14,1	ø	no.	no.	614	
28	47/m	+(MM)	145/150	9,6	C+H	no.	no.	3033	
29	66/m	ø		13,8	ø	no.	no.		
30	66/m	ø	19/50	13,2	ø	no.	no.	220	
31	50/w	+(DÜ)			O	no.	no.		
32	70/w	ø	20/49	15,1	ø	no.	no.	318	
33	72/w	ø	35/53	16,1	ø	no.	no.	351	
34	59/m	+(LE)	28/45	15,4	ø	no.	no.		
35	75/m	+(MM)		11,9	H	no.	no.	230	
36	63/m	+(MM)	21/48	15,5	H	no.	no.		
37	45/m	ø	21/45	17,5	ø	no.	no.		
38	59/m	+(LU)	47/92	13,6	R	no.	no.		
39	53/w	ø	19/31	15,0	ø	no.	no.		
40	44/m	ø			ø	no.	no.		
41	45/w	+(LU)	13/24	14,1	H	no.	no.	17	
42	26/m	ø	1/3	16,9	ø	no.	no.	118	

Weder die Überprüfung dieser Fluktuation zwischen prä- und postoperativen CEA-Werten noch der Vergleich der Serumspiegel unter bzw. über 3 ng/ml in Bezug auf das Tumorstadium (Einteilung in zwei Gruppen: T_1 und T_{2-4}) ergab nach Analyse mit dem exakten Test von FISHER signifikante Unterschiede.
Nach Addition der Einzel- und Verlaufsbestimmungen ergibt sich folgendes Bild: von insgesamt 42 prätherapeutischen Bestimmungen waren 2 gering und 4 mäßig erhöhte, von insgesamt 36 Kontrollen "Nach bzw. unter Behandlung" 4 gering und 2 mäßig erhöhte CEA-Serumkonzentrationen zu verzeichnen.
Bei den Spätkontrollen wiesen 3 der 19 Patienten mit einer Progredienz ihrer Tumorerkrankung gering erhöhte Titer (3,7 , 4 und 4,7 ng/ml) auf, während alle Werte der 21 rezidivfreien

Tabelle 11

PRÄ- UND/ODER POSTTHERAPEUTISCHE CEA-KONZENTRATIONEN IM SERUM VON PATIENTEN MIT EINEM NIERENKARZINOM IN ABHÄNGIGKEIT VOM STADIUM DER ERKRANKUNG (Konzentration in ng/ml).

	Tumor - stadium	Vor Behandlung				Nach bzw. unter Behandl.			
		≦ 3	3-5	5-15	Σ	≦ 3	3-5	5-15	Σ
EINMALIG	$T_1 \quad N_0 \; M_0$	2			2				
	$T_{2-3} \; N_0 \; M_0$	4		2	6	2			2
	" $N_0 \; M_1$					2			2
	" $N_1 \; M_0$					3			3
	" $N_1 \; M_1$					1			1
	$T_4 N_{1-4} M_1/X$	5		1	6				
	Σ	11		3	14	8			8
VERLÄUFE	$T_1 \quad N_0 \; M_0$	3			3	3			3
	$T_{2-3} \; N_0 \; M_0$	15	1	1	17	13	2	2	17
	" $N_0 \; M_1$	2			2	2			2
	" $N_1 \; M_0$	2			2	2			2
	" $N_1 \; M_1$	1			1	1			1
	$T_4 N_{1-4} M_1/X$	2	1		3	1	2		3
	Σ	25	2	1	28	22	4	2	28
EINMALIG + VERLÄUFE		36	2	4	42	30	4	2	36
SPÄTKONTROLLEN:	Mit Rezidiv					16	3		19
	Ohne Rezidiv					21			21
	Σ					37	3		40
Tumorstadium nicht beurteilbar						17			17

Personen ebenso wie die der 17 Kranken, über die keine klinischen Angaben zu erhalten waren, im Normbereich lagen.

2.3.3.2.2 AFP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom

Normalwerte

121 von 140 gesunden Erwachsenen hatten AFP-Serumspiegel unter 5 ng/ml, bei den restlichen 19 lagen die Serumkonzentrationen zwischen 5 und 14 ng/ml. Eine Untersuchung der Häufigkeitsverteilung war wegen der Lage eines Großteils der Werte unter der Empfindlichkeitsgrenze des Assays nicht möglich.

Werte bei Nierenkarzinomkranken

Die AFP-Serumspiegel der 89 Patienten, über die klinische Angaben vorlagen, sind in den Tabellen 9 und 10 aufgeführt. Von insgesamt 106 untersuchten Kranken wiesen nur zwei Serumkonzentrationen über 15 ng/ml auf: 37 und 30 ng/ml. In ersterem Fall war eine ausgeprägte Metastasierung in die Leber bekannt, bei dem anderen Patienten bestand kein Hinweis auf Filiae.

2.3.3.2.3 Ferritin-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom

Normgrenze

Nach Vortestung des kommerziellen Radioimmunoassays (RIA-gnost Ferritin der Fa. BEHRINGWERKE AG) wurde ein Wert von 250 ng/ml als günstigste obere Normgrenze angesehen.

Werte bei Nierenkarzinomkranken

Die Serum-Ferritin-Spiegel der 54 untersuchten Nierenkarzinom-Patienten sind den Tabellen 9 und 10 zu entnehmen, die Tabelle 12 enthält eine Zusammenstellung dieser Befunde unter Berücksichtigung des Erkrankungsstadiums sowie des Behandlungszeitpunktes ("Vor Behandlung" und "Nach bzw. unter Behandlung"), aufgeschlüsselt nach Einzelbestimmungen und Verläufe. Dabei

Tabelle 12

FERRITIN-KONZENTRATIONEN (VOR BEHANDLUNG UND/ODER NACH BZW. UNTER BEHANDLUNG) IM SERUM VON PATIENTEN MIT EINEM NIEREN-KARZINOM IN ABHÄNGIGKEIT VOM STADIUM DER ERKRANKUNG (Konzentration in ng/ml).

	Tumor - stadium	Vor Behandlung ≦ 250	>250	Σ	Nach bzw. unter Behandl. ≦ 250	>250	Σ
EINMALIG	T_{1-2}	1	4	5			
	T_{3-4}	2	6	8			
	Σ	3	10	13			
VERLÄUFE	T_{1-2}	3	3	6	1	5	6
	T_{3-4}	2	8	10	1	9	10
	Σ	5	11	16	2	14	16
EINMALIG + VERLÄUFE		8	21	29	2	14	16
SPÄTKONTROLLEN:	Mit Rezidiv				5	8	13
	Ohne Rezidiv				7	5	12
	Σ				12	13	25

wurden auf Grund der geringen Fallzahlen aus den klassifizierten Stadien nur zwei Gruppen gebildet: T_{1-2} und T_{3-4}.
Für die 54 Kranken (präoperative Einzel- und Verlaufsbestimmungen, Spätkontrollen) wurden Ferritinkonzentrationen zwischen 17 und 3033 ng/ml mit einem arithmetischen Mittel von $\bar{x} = 563,6 \pm 629$ ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 111,6% gemessen. Nach Korrektur dieser extremen Streubreite durch Elimination der oberen sechs Werte ergab sich bei einem Mittelwert von $\bar{x} = 391,7 \pm 290,9$ ng/ml (V.K. = 74,3%) ein Median von 320,0 ng/ml und somit eine linksschiefe Verteilung, wobei die zentralen 80% des Kollektivs Serumspiegel zwischen

68,6 und 906,7 ng/ml aufwiesen.
Von 29 vor Behandlungsbeginn durchgeführten Bestimmungen lagen 8 im Norm- und 21 im erhöhten Bereich, eine Verteilung, die sowohl die 13 Einzel- (3 normale und 10 erhöhte Werte) als auch die 16 Verlaufsmessungen (5 normale und 11 erhöhte Werte) ohne wesentliche Abweichungen boten und die nach Aufgliederung in die beiden Kollektive T_{1-2} und T_{3-4} z.T. auch wegen der kleinen Stichprobenumfänge keine statistisch signifikanten Unterschiede (U-Test, exakter Test von FISHER) zwischen diesen Gruppen ergab. Bei den postoperativen Kurzzeitkontrollen (2 - 3 Wochen post op.) kam es dann zu einer signifikanten Änderung (WILCOXON-Test für Paardifferenzen, p 0,05) der Serumkonzentrationen: 14 Patienten, darunter 5 mit prätherapeutisch normalen Werten, wiesen nun höhere Spiegel auf, 2 mal war ein Spiegelabfall, davon 1 mal unter die Normgrenze, zu verzeichnen. Somit lagen von 16 Abschlußkontrollen 2 im Norm- und 14 im pathologischen Bereich.
Für die 25 Spätkontrollen konnten in 12 Fällen normale und in 13 Fällen erhöhte Ferritinwerte erhoben werden. Nach Berücksichtigung der Aktivität des malignen Prozesses läßt sich zwar bei Vergleich der 12 Rezidiv- und Metastasen-freien Personen (5 pathologische Ferritin-Spiegel) mit den 13 Patienten, deren Tumorerkrankung progredient war (8 pathologische Spiegel), im exakten Test nach FISHER kein signifikanter Unterschied eruieren, es fällt jedoch auf, daß die erstere Gruppe im Mittel durchwegs geringere Serumkonzentrationen ($\bar{x}$ = 292,75 $\pm$ 251,53 ng/ml; V.K. = 85,9%) aufwies als die letztere ($\bar{x}$ = = 868,85 $\pm$ 802,32 ng/ml; V.K. = 92,3%). Diese Differenz ist signifikant (U-Test, p 0,02).

2.3.4 D I S K U S S I O N

2.3.4.1 METHODISCHER TEIL

2.3.4.1.1 Gewebe-Extraktion

Nierenkarzinom-Extrakte

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden nach zwei verschiedenen Methoden hergestellte Nierenkarzinomgewebsextrakte eingesetzt: ein saliner (HE 7/75; HE 2a/76) und ein PCA- (Perchlorsäure-) Extrakt (HE 2b/76).
Saline Extraktion: Die Forderung nach einem möglichst viele lösliche Zellbestandteile enthaltenden Eiweißextrakt mit minimalem selektivem Proteinverlust als Basis einer Suche nach TAA gab den Ausschlag für die Wahl dieses Verfahrens, das mit mehr oder weniger ausgeprägten Modifikationen für viele Problemstellungen, unter anderem für die Reinigung von CEA (z.B. 66, 67, 110, 186) sowie in Publikationen über Tumorantigene des Nierenkarzinoms (109, 161, 166, 194, 205, 214) beschrieben ist. Im Vergleich zu dieser Präparation war die von einigen Gruppen (z.B. 229) angewandte 3 M KCl-Extraktion bei ansonsten gleichem Antigengehalt mit dem Nachteil behaftet, daß sie im Falle des Ferritins nach den Erfahrungen dieses Arbeitslabors (128) zu einer partiellen Aufsplitterung des Moleküls führte, weshalb Ferritin-Aktivität nach gelchromatographischer Auftrennung des Extraktes auch in Fraktionsbereichen kleineren Molekulargewichtes nachgewiesen werden konnte.
Zur Entfernung von im ionenarmen Milieu instabilen Proteinen und Proteinkomplexen wurde das dialysierte, stark getrübte und ausgesprochen schlecht filtrierbare Extraktkonzentrat hochtourig (163 000 g) zentrifugiert und danach erst ultrafiltriert (Bakterienfilter, Porengröße 0,2 µm) und lyophilisiert. Wie die OUCHTERLONY-Untersuchung auf Serumproteine (Abb. 3) zeigt, enthielt die so behandelte Gewebepräparation noch hochmolekulare Substanzen wie $Alpha_2$-Makroglobulin (MG = 800 000 d).

PCA-Extraktion: Diese Form der Reinigung von Karzinomgewebspräparationen durch selektive Präzipitation der meisten Proteine mit Ausnahme von Glykoproteinen, die die überwiegende Mehrheit zellgebundener Proteine ausmachen, wurde mit geringfügigen Abweichungen vom Originalverfahren nach KRUPEY et al. (119) vorgenommen. Der so gewonnene Extrakt enthielt in Übereinstimmung mit Literaturangaben z.B. noch Albumin und die Seromukoide Alpha$_1$-saures Glykoproteid und Alpha$_1$-Antitrypsin (126, 128, 170) sowie darüberhinaus Alpha$_1$-Antichymotrypsin. Nicht mehr nachweisbar und somit durch die Prozedur zerstört bzw. ausgefällt waren das mit Ferritin und das mit Lactoferrin kreuzreagierende Antigen.

Extrakte aus normalem Nierengewebe

Wie bereits im Abschnitt "Untersuchungsmaterial" dargelegt, wurde als Normalgewebsquelle zur Absorption der Antiseren anfangs der "Normalanteil" der Hypernephromnieren (NNE 7/75) herangezogen. Diesem Vorgehen lag die Überlegung zugrunde, daß alle Tumorextrakte in großem Umfang Normalgewebskomponenten enthalten, die bei Immunisierung der Kaninchen eine ausgeprägte Antikörperbildung induzieren. Folglich macht die Absorption der Antiseren mit fremdem Nierenextrakt eine Unterscheidung tumorassoziierter Antigene von den normalen, individualspezifischen wegen allogenetischer Differenzen zwischen den Spendern von Tumor- und Normalmaterial sehr problematisch. Wiederholten Berichten zufolge über Ablagerungen von Tumorantigen-Antikörper-Komplexen in den Glomeruli solcher Nieren bei assoziiertem Nierenkarzinom (99, 161), aber auch bei anderen malignen Erkrankungen (100, 131), mußte jedoch angenommen werden, daß eine Absorption der xenogenen Seren mit diesem Normalextrakt auch zur Präzipitation von Anti-Tumorantigen-Antikörpern führen kann. Auch hatte LAMERZ (126) bei seinen Untersuchungen über carcinofetale Antigene in den "normalen" Gewebspartien von Dickdarmkarzinomen deutlich erhöhte CEA-Konzentrationen gefunden. Für die weiteren Experimente wurde deshalb nur mehr der Extrakt aus einer wegen Gefäßanomalien nicht transplantablen Unfallniere (NNE 3/76) verwandt. Daß die hiermit behandelten Antiseren

auch Antikörper gegen normale, individualspezifische Antigene aufweisen, stellt eine prinzipielle Schwierigkeit dieser Methodik dar (68).

2.3.4.1.2 Gelfiltration und Immunadsorption

Wie aus der immunelektrophoretischen (Abb. 2) und der OUCHTERLONY-Untersuchung (Abb. 3) zu ersehen ist, entspricht die Zusammensetzung der salinen Extrakte in vieler Hinsicht der eines Normalserums (die salinen Extrakte enthalten alle wesentlichen Serumproteine mit Ausnahme von IgM). Deswegen wurde die Gelfiltration, die ein verbreitetes Verfahren zur präparativen Fraktionierung von Serumproteinen nach ihrem Molekulargewicht darstellt, in Form der Sephadex G 200-Chromatographie für die Auftrennung dieser Gewebspräparationen erprobt und, nachdem sie im Vergleich zu anderen Methoden (s. unten) die reproduzierbareren Ergebnisse lieferte, zu ihrer weiteren Reinigung eingesetzt. Durch die zusätzliche Verwendung von Sepharose 6B und Sephadex G 100 und Kombination der drei Säulentypen in der unter "Eigene Ergebnisse" beschriebenen Reihenfolge ließ sich die Auflösung zwischen den einzelnen Fraktionsbereichen noch optimieren (Abb. 6 und 9), wobei die Sepharose 6B anstelle von Sepharose 4B auf Grund ihrer genaueren Abtrennung der höhermolekularen Substanzen von den in Fraktion II gefundenen mit Ferritin und Lactoferrin kreuzreagierenden Antigenen bevorzugt wurde.
Als weniger gut geeignet für die Auftrennung von salinen Extraktproteinen erwiesen sich nach Prüfung in Vorversuchen folgende Methoden: die Karton-Elektrophorese, die DEAE-Zellulose-Chromatographie sowie die präparative Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, die z.B. WRIGHT et al. (229) in modifizierter Form zur Fraktionierung ihres Nierenkarzinomextraktes benutzt hatten.

Das Karton-Elektrophorese-Verfahren, das LAMERZ (126) zur Isolierung von AFP erfolgreich angewandt hatte, lieferte fünf voneinander unscharf abgesetzte Banden, deren ausgeprägtes "Tailing" durch die manuelle Auftrennung der Einzelfraktionen mittels Schere noch verstärkt wurde und deshalb eine reproduzier-

bare Auswertung erschwerte.
Die DEAE-Zellulose-Chromatographie führte zu bis zu zwölf Peaks mit einer breiten Streuung von Extraktproteinen über mehrere Fraktionsbereiche. Da uns zum damaligen Zeitpunkt kein automatischer Gradientenmischer zur Verfügung stand, konnte das mit diesem methodischen Vorgehen erzielte schlecht reproduzierbare Trennergebnis nicht verbessert werden.
WRIGHT et al. (229) hatten ihre 3 M KCl-Gewebspräparationen zur weiteren Reinigung einer präparativen Acrylamid-Gel-Gradient-Elektrophorese (Stufengradient mit vier verschiedenen Gelkonzentrationen) unterzogen und hiermit acht Fraktionsbereiche erhalten, von denen nach Zerschneidung und Extraktion des Gels einer das von ihnen beschriebene Tumor-assoziierte Antigen enthielt (Nachweis mittels LMI, s. S. 33). Ausgiebige Vorversuche unter Anwendung einer präparativen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution der Fraktionen zeitigten jedoch in unserem Fall keine verwertbaren Resultate insofern, als diese Methode mit der von uns eingesetzten Apparatur (COLORA MESSTECHNIK GmbH) eine brauchbare Auftrennung des Eiweißspektrums der salinen Extrakte nur bis zu einem Molekulargewicht von ca. 80 000 d (Albumin, $Alpha_1$-Antitrypsin) erlaubte.

Zur abschließenden Reinigung und Gewinnung von Ausgangsmaterial für erneute Immunisierungen wurde die Affinitätschromatographie mit an CNBr-aktivierte Sepharose 4B angekoppeltem Antikörper der Antiseren, die nach der unter "Eigene Ergebnisse" dargestellten Absorptionsprozedur noch ausreichende Aktivität zeigten, herangezogen. Die in der Literatur für die Isolierung von CEA und AFP (126, 152, 199) erfolgreich angewandte und aus diesem Grunde für die ersten Säulen der vorliegenden Arbeit ebenfalls praktizierte Elution des spezifisch gebundenen Materials mittels pH-Wechsel führte jedoch wegen der Säureempfindlichkeit der mit Ferritin und Lactoferrin kreuzreagierenden Antigene genauso wie die PCA-Extraktion zu deren Zerstörung und wurde deshalb aufgegeben. Stattdessen erfolgte die Entkoppelung der III. Fraktion mit einem fast pH-neutralen Puffer höherer Ionenstärke (2 M Kaliumthiocyanat).

2.3.4.1.3 Antiseren

Aus der Zielvorstellung einer partiellen Isolierung und Charakterisierung von Tumor-assoziierten Antigenen mittels xenogener Antiseren ergibt sich die Forderung nach einem möglichst hohen spezifischen Titer dieser Antikörperpräparationen. Maßgebende Faktoren hierfür sind die Wahl einer geeigneten Tierspezies (Antigene können in verschiedenen Tierspezies unterschiedlich ausgeprägte Immunantworten provozieren), eines wirksamen Immunisierungsschemas und als Voraussetzung die entsprechende Immunogenität des Antigens, d.h. seine Fähigkeit, in einem heterologen Wirt eine Antikörper-Bildung auszulösen. Die gewünschte Spezifität läßt sich dabei prinzipiell auf mehreren Wegen erreichen:

- Die Verwendung eines gereinigten Antigens führt im Idealfall zu sehr spezifischen Antiseren, die in der Regel wegen bestehender Kreuzreaktionen zu verwandten Substanzen noch eine geringfügige Absorption erfordern.
- Die breitspektrale Immunisierung mit unreinen Gesamtextrakten (vor allem salinen Extrakten) verlangt eine intensive Absorption mit Serum-, Normalgewebsproteinen und Erythrozyten mit der Folge eines meist nur sehr niedrigen spezifischen Antikörper-Titers. Eine effizientere Ausbeute kann hier die Benutzung von vorfraktioniertem Material erbringen.
- Als weitere, relativ aufwendige Möglichkeit bietet sich die z.B. von GOLD et al. (68) praktizierte mehrmalige intravenöse Verabreichung von Normalgewebsextrakten an neonatale Tiere zur Erzeugung einer immunologischen Toleranz. Die spätere Immunisierung der adulten Tiere mit Tumorgewebsproteinen induziert dann nur mehr eine Antikörper-Bildung gegen tumorspezifische antigene Determinanten. Mit dieser Methode erzielten die Autoren ebenso gute Resultate wie mit den oben genannten.

Die relativ kurzen Immunisierungszeiten (8 - 10 Wochen) sowie die guten Erfahrungen in diesem Arbeitslabor bei der Isolierung von CEA und AFP gaben den Ausschlag für die Wahl eines Schemas in Anlehnung an HIJMANS (93), das im Abschnitt "Methodik" be-

schrieben ist. Als Antigenpräparationen wurden zunächst unter dem Gesichtspunkt einer Suche nach Tumor-assoziierten Antigenen saliner Gesamtextrakt sowie zur Einschränkung des Immunogenspektrums mittels Gelfiltration vorfraktionierter bzw. mittels PCA-Fällung vorgereinigter Tumrogewebsextrakt verwandt. Die Absorption der Antiseren erfolgte mit humanem lyophilisiertem Normalserum und nach Überprüfung der verbliebenen Reaktionen (in einem Teil der Fälle) mit normalem Nierenextrakt, desweiteren mit Erythrozyten der Blutgruppe AB und 0 (dieser Schritt wurde zur Erfassung eventueller Kontaminationen der Antiseren mit Anti-A/B-Antikörpern aus den für die Absorption eingesetzten Normalseren und -extrakten immer zuletzt durchgeführt). Hierbei ließ sich die Aktivität der Antiseren gegenüber Nierenkarzinomproteinen durch die Verwendung von NNE 7/75 vollständig absorbieren. Nachdem der spezifische Antikörper-Titer auch mit NNE 3/76 bis unter die Nachweisgrenze reduzierbar und somit für eine Affinitätschromatographie nicht verwertbar war, wurde auf diesen Schritt verzichtet und die chromatographische Isolierung der Immunglobuline mittels DEAE-Zellulose vorgenommen (Abb. 12 und 13). Die erste Fraktion enthielt reine IgG (auch in diesem Zusammenhang nicht störende unspezifische Human- und Kaninchen-IgG) und wurde zur Immunadsorption herangezogen, die partiell verunreinigten, jedoch noch deutlich reaktiven Fraktionen (D II - D IV) standen als Prüfseren für OUCHTERLONY-Untersuchungen zur Verfügung.
Mit diesen Maßnahmen, die im Falle des mit Ferritin kreuzreagierenden Antigens noch um einen affinitätschromatographischen Reinigungsschritt mittels an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelter Anti-Albumin-Antikörper erweitert wurden, ließ sich (allerdings erst nach Verwendung von 2 M KSCN zur Elution der III. Fraktion) das Eiweißspektrum der Extrakte erheblich vermindern und in Folgeimmunisierungen eine spezifischere Antikörper-Bildung erreichen.

2.3.4.1.4 Partielle Reinigung von Tumor-assoziierten Proteinen

2.3.4.1.4.1 Ferritin

Ferritin ist ein im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitetes eisenhaltiges Protein, das auch in vielen humanen Geweben und im Serum nachgewiesen werden kann. Das Interesse an ihm als Tumor-assoziierter Substanz basiert hauptsächlich auf den Erkenntnissen, daß

- viele Tumoren und Seren von Malignom-Patienten signifikant erhöhte Ferritinkonzentrationen aufweisen,
- möglicherweise auch ein qualitativer Unterschied von Tumorgewebs-Isoferritinen gegenüber denen des korrespondierenden Normalgewebes in Bezug auf elektrophoretische und immunologische Eigenschaften besteht (136).

Vor Diskussion dieser Aspekte sowie (im "Klinischen Teil") seiner potentiellen Bedeutung als "Tumormarker" soll noch kurz auf seine strukturelle und immunologische Heterogenität eingegangen werden.

Struktur

Das Apoferritin (Proteinanteil des Ferritins), mit dessen Hilfe Zellen freies Eisen zu metabolisieren und deponieren vermögen, ohne dessen toxischen Effekten ausgesetzt zu sein, besitzt ein ungefähres Molekulargewicht von 450 000 d (zwischen 430 000 und 490 000 d) (147) und umgibt in Form einer Proteinhülle eine Mizelle aus Eisen(III)-oxyhydroxidphosphat bei einer maximalen Speicherkapazität von etwa 2300 Atomen pro Molekül (136). Zusammengesetzt ist es aus 24 nach neueren Untersuchungen nicht identischen Proteinuntereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen ca. 19 000 und 21 000 d (jedes Ferritin besitzt zwei bis drei verschiedene Polypeptidketten-Typen, wobei die schwereren Untereinheiten vorwiegend in den sauren Isoferritinen vertreten sind) (136, 147), die unter Ausbildung von elf Wasserstoff- bzw. Salzbrücken zwischen je zwei Untereinheiten sowie durch ihren relativ hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (insbesondere Leucin) die außerordentlich stabile Quartär-

struktur realisieren und erst unter drastischen physikalischen (Temperaturen über 100°C) und chemischen (Senkung des pH-Wertes unter 2,8; Behandlung mit Natriumdodecylsulfat) Bedingungen dissoziieren (225). Für den Mechanismus der Eisenaufnahme, die sich durch die Bruttogleichung

$$\text{Apoferritin} + Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow \text{Ferritin}$$

formulieren läßt, wurden verschiedene Modellvorstellungen entwickelt (225), er ist jedoch bis heute nicht restlos geklärt.

Gewebespezifität und Heterogenität

Ferritinpräparationen enthalten gewöhnlich neben Monomeren auch Dimere, Trimere und größere Aggregate, die sich z.B. nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese in multiplen Banden lokalisieren lassen (durch Gelfiltrations-Chromatographie leicht voneinander zu trennen) und somit heterogen erscheinen. Darüberhinaus weisen die Monomere selbst jedoch eine "echte", sogenannte Mikroheterogenität auf, die auf Differenzen in der Aminosäurensequenz beruht und die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Moleküle erklärt (136, 147). So resultiert die isoelektrische Fokussierung von den im Humansystem am besten untersuchten und deshalb als normaler "Referenz-Standard" (136) angesehenen Isoferritinen der Leber (neben Milz und Knochenmark besonders Ferritin-reich) in sieben Hauptbanden mit pI-Werten zwischen 5,1 und 5,6. Isoferritine, deren isoelektrischer Punkt unter oder über diesem Bereich liegt, werden als sauer bzw. basisch bezeichnet. Ihre variable Zusammensetzung ergibt für jedes Gewebe ein spezifisches Muster.
Diese chemischen Differenzen finden ihren Ausdruck in einer immunologischen Heterogenität. Saure Isoferritine, die vor allem in Niere, Herz und Tumoren nachweisbar sind, besitzen neben mit den Ferritinmolekülen anderer Gewebe und sogar anderer Spezies kreuzreagierenden antigenen Determinanten auch solche, die basischen Isoferritinen fehlen und umgekehrt. Desweiteren sind die basischen Ferritinkomponenten wesentlich immunogener als die sauren, d.h. die Immunisierung von Kaninchen mit einer Mischung aus sauren und basischen Isoferritinen löst primär

eine Antikörper-Bildung gegen letztere aus (136). Aus diesen Gründen können Untersuchungen über die Isoferritinzusammensetzung der einzelnen Gewebe bzw. radioimmunologische Serumferritinkonzentrationsbestimmungen in Abhängigkeit von dem zur Herstellung der Antiseren injizierten Antigentyp irreführende Resultate liefern (86, 98, 136), weil die sauren Isoferritine durch viele Antikörperpräparationen nicht oder nur schlecht erfaßt werden.

Ferritin in Tumorzellen

Tumorzellen können sich die Fähigkeit, Ferritin zu produzieren und durch Eisenzugabe zu einer erhöhten Syntheserate dieses Speichermoleküls aktiviert zu werden, erhalten, wie RICHTER (181) im Jahre 1965 erstmals zeigte. Seither war man bemüht, neben rein quantitativen vor allem auch qualitative Unterschiede zwischen Tumor- und Normalferritinen aufzuspüren und sie diagnostisch zu verwerten. Saure Isoferritine, die in Hepatomzellen und in fetaler Leber, nicht jedoch im korrespondierenden Normalgewebe, gefunden (49, 130) und deshalb von einigen Autoren (z.B. 49) ursprünglich als "carcinofetal" bezeichnet wurden, konnten jedoch auch in Herz und Niere nachgewiesen werden, und trotz der Befunde einzelner Untersucher über mehr saure Ferritine in menschlichen und tierischen Tumoren, die übrigens z.B. von der Arbeitsgruppe von MUNRO (147) unter Anwendung verschiedener Elektrophoresesysteme nicht bestätigt wurden, gibt es zur Zeit keinen Hinweis auf die Existenz malignomspezifischer Untereinheiten. Die folgenden Ausführungen erstrecken sich daher auf eher quantitative Aspekte eines Ferritinvorkommens in entarteten Zellen.

Leukozyten von Patienten mit akuter und chronischer myeloischer Leukämie produzieren im Vergleich zu Normalleukozyten die zwei- bis sechsfache Menge an Ferritinmolekülen, deren z.T. niedrige Dichte (akute myeloische Leukämie) auf einen geringen Eisengehalt hindeuten (226). Nur in wenigen der überprüften Fälle war eine Verschiebung zu sauren Isoferritinen feststellbar, und mit Ausnahme einer Zellprobe ergab sich kein Anhalt für abnorme Untereinheiten (40). Auch betroffene Gewebebezirke von M. HODGKIN-Kranken enthalten erhöhte Ferritinkonzentrationen,

die mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Lymphozyten synthetisiert werden (191). Der genaue zelluläre Ursprung dieser Proteine ist jedoch bis jetzt nicht geklärt (136).
Mittels immunfluoreszenz-optischer Methoden fanden MARKUS und ZINBERG (135) Ferritin in primärem und metastatischem Mammakarzinomgewebe, nicht jedoch in korrespondierenden Normalzellen der Brustdrüse. Die anschließende Isolierung, die ebenfalls nur aus Malignomgewebe gelang, ergab ein überwiegend saures pI-Spektrum. Auch für andere Tumoren wie z.B. Pankreaskarzinom (135), Ovarialkarzinom (127) und Lungenkarzinom (128, 217) wurde das Vorkommen von Isoferritinen bzw. "ferritin-like antigens" beschrieben.
Bezüglich der Untersuchungsbefunde der vorliegenden Arbeit über ein mit Ferritin kreuzreagierendes Antigen in salinen Nierenkarzinom- und normalen Nierenextrakten können keine entsprechenden pI-Werte angegeben werden, da eine Isoelektrofokussierung noch nicht durchgeführt wurde. Der Molekulargewichtsbereich (Fraktion II = $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ d), die Instabilität bei pH-Werten = 2,8 sowie die Tatsache, daß es mit Ferritin ausgeprägte antigene Determinanten teilt, weisen auf ein Isoferritin hin. In Abbildung 16a, in der das Antiserum "Carmen" zwei Präzipitationslinien gegenüber dem "ferritin-like antigen" des Tumorextraktes bildet, scheint eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen diesem Antigen und dem mit Lactoferrin kreuzreagierenden Antigen zum Ausdruck zu kommen. Diese Befunde konnten jedoch in weiteren Ansätzen (Abb. 16b und 19) nie bestätigt werden und sind wahrscheinlich durch Überlagerungen wegen des gleichen Molekulargewichtsbereiches des mit Lactoferrin kreuzreagierenden Antigens (ebenfalls Fraktion II) bedingt.

2.3.4.1.4.2 Lactoferrin

Lactoferrin, 1939 von SØRENSEN und SØRENSEN (204) in Kuhmilch entdeckt, ist ein wasserlösliches, einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 86 000 d (7, 168), das pro Molekül zwei Fe^{3+}-Ionen in Verbindung mit zwei Molekülen Hydrogencarbonat aufzunehmen vermag. In diesen und anderen Eigenschaften wie z.B. den optischen und paramagnetischen Resonanz-

spektren, der Aminosäurensequenz und der bakteriostatischen Wirkung des Apoproteins gegenüber verschiedenen Bakterien ähnelt es sehr dem im Blutplasma zirkulierenden Transferrin (87), mit dem es immunologisch jedoch nicht verwandt ist, d.h. zwischen beiden Proteinen besteht im nativen, nicht denaturierten Zustand keine Kreuzreaktivität. Zusätzlich unterscheidet sich Lactoferrin von Transferrin auch durch seine weitgehend erhaltene Affinität zu Eisen bei pH-Werten zwischen zwei und vier, Bedingungen, unter denen Transferrin vollständig als Apoprotein vorliegt, und für die beiden Moleküle existieren verschiedene Rezeptoren (Lactoferrin-Rezeptoren z.B. auf Monozyten- und Lymphozyten-Membranen, Transferrin-Rezeptoren auf Retikulozyten-Membranen) (23).
Lactoferrin, das eine ausgeprägte Neigung zur Ausbildung von Komplexen mit saureren Proteinen wie Albumin und Casein aufweist (14, 218) und deshalb je nach Reinheitsgrad elektrophoretisch im Beta- oder Gamma-Bereich wandert (218), kommt in vielen exokrinen Drüsengeweben (z.B. laktierender Mamma, Pankreas, Magen- und Dünndarmepithelzellen, Bronchial-, Speichel-, Tränen- und Cervix uteri-Drüsen) und ihren Sekreten sowie in den Granula neutrophiler Leukozyten vor (13, 36, 138). Trotz der weiten Verbreitung ist über seine biologische Funktion bis heute wenig bekannt (14). Als einigermaßen gesichert gilt, daß es auf Grund seiner hohen Affinität zu Eisen in Verbindung mit der größtenteils ungesättigten Bindungskapazität (im Blut ist Lactoferrin nur zu etwa 20% gesättigt) (218) zu einer Eisenverarmung im Sekretmilieu bzw. im interstitiellen Raum des entzündlich veränderten Gewebes nach Freigabe durch Granulozyten führt und damit eine bakterizide Wirkung auf Mikroorganismen ausübt (29, 134). Darüberhinaus scheint ihm als Bestandteil der Pankreas- und Gallenflüssigkeit noch eine Rolle im Eisentransport, der erst nach Bindung des Lactoferrin-Eisenkomplexes an Lactoferrin-Rezeptoren im Dünndarm erfolgt, zuzukommen (39).
Erhöhungen seines Serumspiegels, der von einzelnen Autoren etwas unterschiedlich angegeben wird (134) und z.B. nach den radioimmunologischen Untersuchungen von BENNET und MOHLA (13) zwischen 0,4 und 2,2 µg/ml, für menstruierende Frauen gering-

fügig niedriger, liegt, werden denn auch vor allem bei infektiösen Prozessen gefunden und für die mit diesen oft einhergehende Hyposiderämie verantwortlich gemacht (134). In Analogie hierzu sind abnorm hohe Lactoferrin-Konzentrationen ebenfalls im Sekret der mastitisch veränderten Mamma (168), in arthritischen Exudaten (134) sowie im Pankreassekret bei chronisch kalzifizierender Pankreatitis (36, 54, 55) nachweisbar. In letzterem Fall läßt sich die Tatsache, daß das Pankreaskarzinom mit normalen oder sogar erniedrigten Lactoferrin-Sekretwerten verbunden ist, nach Meinung einiger Autoren (54, 55) zur Differentialdiagnose zwischen diesen beiden Erkrankungen ausnützen. Desweiteren wurden pathologisch hohe Lactoferrin-Serumkonzentrationen unter anderem noch für den sekundären Hypersplenismus infolge einer Leberzirrhose (13) sowie die chronisch myeloische Leukämie (13), die chronische Granulozytenleukämie (154) und die Polycythaemia vera (13) beschrieben, während erniedrigte Werte z.B. für die Eisenmangelanämie (134), die Agranulozytose (14, 153) und die akute myeloische Leukämie (155) typisch sind.

Nur wenig Literaturangaben waren bezüglich eines Vorkommens von Lactoferrin in Tumorgewebe zu erhalten. MASON und TAYLOR (138) beobachteten mittels einer Immunoperoxidase-Technik schwach positive Reaktionen in einzelnen Arealen eines Basalioms, nicht jedoch in vergleichbaren Bezirken von normaler Haut. VELTRI et al. (217) und LAMERZ et al. (128) fanden im Extrakt aus Plattenepithelkarzinomen der Lunge ein mit Lactoferrin kreuzreagierendes PCA-labiles Antigen mit einem Molekulargewicht im Bereich von 2×10^5 bis 10^6 d (128), das immunelektrophoretisch $Alpha_2$-Mobilität besitzt (128) und das sie im korrespondierenden Normalgewebe nicht nachweisen konnten. Diese Befunde decken sich weitgehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über ein mit Lactoferrin kreuzreagierendes Antigen im salinen Nierenkarzinomextrakt.
Bezüglich der Existenz von Lactoferrin oder "Lactoferrin-like antigens" in der Niere divergieren die Angaben der uns bekannten Publikationen. Während MASON und TAYLOR (138) und DOBRIN et al. (47) genauso wenig wie wir solche Substanzen in Normalgewebspräparationen zu entdecken vermochten, berichteten

POORTMANS und BIENENSTOCK (176) über die Synthese von Lactoferrin durch kultivierte Nierenzellen. Da sie jedoch als Ausgangsmaterial für alle Kulturen nur pathologisch verändertes Nierengewebe (chronische Pyelonephritis, Immunkomplex-Glomerulonephritis, maligne Nephrosklerose) verwandt hatten, konnten sie eine Herkunft dieses Proteins aus Leukozyten nicht ausschließen.

Wie bereits erwähnt, besitzt das von uns beschriebene Antigen ein Molekulargewicht zwischen 2×10^5 und 10^6 d. Dieser Bereich läßt sich jedoch weiter einengen, wenn man die Befunde der Abbildungen 16b, 19 und 20 berücksichtigt, in denen die Präzipitationslinie des mit Lactoferrin kreuzreagierenden Antigens näher am Extraktreservoir liegt als die der mit Ferritin kreuzreagierenden Substanz: da es sich bei der letzteren um ein Isoferritin zu handeln scheint, muß das erstere also schwerer als ca. 450 000 d sein. Die Tatsache, daß auch eine Behandlung unserer Gewebspräparationen mit dem Detergenz Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 20% keine Änderung dieser Ergebnisse bewirkte, könnte somit für ein echtes, mit Lactoferrin kreuzreagierendes Antigen sprechen und den Nachweis eines Aggregates aus Lactoferrin und anderen Proteinen wie z.B. Albumin unwahrscheinlich machen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit bietet sich jedoch noch durch die Arbeit von BENNET und KOKOCINSKI (14): diese Autoren, die bei ihren Experimenten zur Isolierung von Lactoferrin aus neutrophilen Granulozyten auf ein ähnliches schweres Protein stießen, das Eisen aufzunehmen vermochte und nach Gelfiltration mittels Sephadex G 200 im Ausschlußvolumen eluierte, sehen darin die Existenz eines Lactoferrin-Proteinkomplexes, den in seine Einzelkomponenten aufzuspalten sie allerdings nicht versucht hatten. Insofern bleibt fraglich, ob die Befunde von BENNET und KOKOCINSKI ohne weiteres auf das von uns gefundene Antigen übertragbar sind. Hier sind weitere Studien erforderlich, um die Natur solcher "hochmolekularen Lactoferrine" (14) bzw. "Lactoferrin-ähnlicher" Substanzen aufzudecken.
Gemeinsamkeiten zwischen unseren Resultaten und den von anderen Autoren beschriebenen Nierenkarzinom-assoziierten Antigenen (s. S. 33 ff.) lassen sich nicht eruieren: das von WRIGHT et al.

(229) partiell gereinigte Antigen besaß ein Molekulargewicht von ca. 70 000 d, das von OZAWA et al. (161) erwähnte Antigen zeigte Kreuzreaktionen mit RTE (renal proximal tubular epithelial antigen). Und die von den Gruppen KISTLER und SONNABEND (103), GHOSE et al. (65) und TEICHMANN et al. (214) veröffentlichten Daten reichen für einen solchen Vergleich nicht aus.

Eine interessante Beobachtung bezüglich der Publikation von KISTLER und SONNABEND (103) über ein sogenanntes fetorenales Antigen (FRA), das ein oder mehrere antigene Determinanten mit dem Hepatitis-B-Antigen teilen soll (s.S. 34), machten allerdings VIERUCCI et al. (220): xenogene Anti-Lactoferrin-Seren reagierten mit Hepatits-B-Antigen (HBAg). Da aber auf der anderen Seite Anti-HBAg-Seren gegenüber gereinigtem Milch-Lactoferrin keinerlei Reaktionen zeigten, nahmen sie an, daß Lactoferrin im HBAg nicht an der Oberfläche exponiert ist oder in denaturiertem Zustand vorliegt, in dem es bekanntermaßen weitgehend veränderte immunologische Eigenschaften aufweist (denaturiertes Lactoferrin kann z.B. mit Transferrin kreuzreagieren). Daß man das FRA von KISTLER und SONNABEND als ein solches denaturiertes Lactoferrin, ein "Lactoferrin-like antigen" oder einen Lactoferrin-Proteinkomplex interpretieren kann, läßt sich nun aus diesen Angaben keineswegs schlüssig folgern. Die Möglichkeit ist jedoch nicht ausgeschlossen.

2.3.4.1.4.3 Weiteres, nicht näher charakterisiertes Protein

Dieses niedermolekulare Protein (Abb. 21), das mittels des Antiserums "Roland" in HE 2a/76 und HE 2b/76 nachgewiesen werden konnte, besitzt wegen seines gleichzeitigen Vorkommens in der gesunden Niere keinerlei Bedeutung als Tumor-assoziierte Substanz. Möglicherweise gehört es zu einer Familie von kleinmolekularen Glykoproteinantigenen, die mehrfach in Tumor- wie Normalgewebspräparationen beschrieben worden sind und dessen Prototyp das NCA darstellt (111). Ein weiterer Hinweis auf die Existenz solcher kreuzreagierender Substanzen in Karzinom- und Normalnieren war die Beobachtung, daß sowohl spezifische Anti-Kolon(PCA-Extrakt)- als auch Anti-Ovarial(PCA-Extrakt)-Seren im Ansatz gegen HE 2a/76, HE 2b/76 und NNE 3/76 eine identische Linie bildeten.

2.3.4.2 KLINISCHER TEIL

2.3.4.2.1 CEA-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom

Nach dem Erscheinen einer Reihe von Publikationen über die klinische Relevanz von CEA-Serumuntersuchungen im Zusammenhang mit malignen Tumoren vor allem des Gastrointestinaltraktes und der Brustdrüse wurde unter anderem auch die Aussagekraft solcher Bestimmungen im Serum und Urin von Nierenkarzinom-Patienten überprüft. Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13
CEA-SPIEGEL IM SERUM UND URIN VON NIERENKARZINOM-PATIENTEN

Autor, Jahr Normgrenze im Plasma(P) bzw. Serum(S) und Urin(U)	Stadium	Plasma N	Plasma +%	Urin N	Urin +%
CHU et al. 1974 (34) (P 2,5 ng/ml)	Primärtumor ohne Metastasen	3	33%		
	Primärtumor mit Metastasen	8	88%		
	Rezidiv	12	33%		
GUINAN et al. 1975 (78) (P 2,5; U 2,3 ng/ml)	inaktiver Prozeß	42	21%	15	13%
	aktiver Prozeß	49	41%	97	5%
HERING et al. 1976 (91) (P 2,5; U 2,3 ng/ml)		17	21%	17	35%
ROST et al. 1976 (185) (S 7,5; U 35 ng/ml)		16	87,5%	15	30%
GRAF et al. 1977 (73) (P 2,5 ng/ml)	Ø Metastasen	2	0%		
	Metastasen	4	75%		

CEA-Bestimmungen im Urin sind mit einigen Problemen behaftet: falsch positive Resultate werden z.B. bei entzündlichen Erkrankungen der Blase und, vor allem bei Frauen, durch Kontamination

mit Genitalsekret erhalten. Während diese Faktoren jedoch durch Verwendung von Mittelstrahlurin oder, wenn möglich, Katheterurin sowie durch gleichzeitige Kontrolle des Urinsedimentes auf Leukozyten und Bakterien vermeidbar sind, vermag die Heterogenität von CEA-positivem Material im Urin nach Auffassung mehrerer Autoren den Wert der Untersuchung sehr wohl zu mindern. So fanden WU et al. (230) zwei solcher Proteine mit einem Molekulargewicht von über 10^6 d bzw. ca. 200 000 d. COOMBES et al. (38) beschrieben drei mit CEA kreuzreagierende Substanzen, die UCEA-1 (ca. 200 000 d, dem CEA ähnlich), UCEA-2 (ca. 60 000 d, mit NCA verwandt) und UCEA-3 (großes Molekül) nannten. Diese und andere Autoren interpretieren deshalb CEA-Urinspiegel sehr kritisch und messen ihnen keine große Bedeutung bei. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit auf CEA-Urinbestimmungen verzichtet.
Bezüglich der CEA-Spiegel in Seren von Nierenkarzinom-Patienten variieren die Literaturangaben z.T. erheblich. ROST et al. (185) z.B. stellten bei 87,5% ihrer Kranken erhöhte Konzentrationen fest, wozu allerdings angemerkt werden muß, daß auch 33% ihres Kontrollkollektivs gesunder Personen und 61% der überprüften schwangeren Frauen Werte über der Normgrenze (7,5 ng/ml) aufwiesen. Und CHU et al. (34) konnten immerhin noch in 56% der untersuchten 23 Fälle pathologische CEA-Werte messen, die mit Ausnahme der Rezidivgruppe eine gute Korrelation zum Schweregrad des malignen Prozesses zeigten (s. Tab. 13) und nach erfolgreichem therapeutischem Vorgehen meist deutlich abfielen.

Die anderen der in Tabelle 13 aufgeführten Autoren berichteten zwar über durchwegs geringere Positivitätsraten, die jedoch im Vergleich zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit immer noch auffallend hoch sind. Wie aus Tabelle 11 im Ergebnisteil ersichtlich, hatten insgesamt nur 11% der von uns untersuchten 107 Nierenkarzinom-Patienten CEA-Serumkonzentrationen über 3 ng/ml, und nur etwa 5% wiesen Spiegel über 5 ng/ml (mäßig erhöht) auf. Auch wenn sich diese erhöhten Werte anscheinend auf die Stadien T_{2-4} sowie die Rezidivgruppe konzentrieren, so läßt sich daraus z.T. schon wegen der zu geringen Fallzahl keine statistisch signifikante Abhängigkeit vom Schweregrad der

Erkrankung ablesen. Desgleichen konnte bei den Verlaufsbeurteilungen trotz einer leichten Fluktuation zwischen prä- und postoperativen CEA-Spiegeln keine signifikante Korrelation zum Therapieerfolg festgestellt werden. Einen solchen Zusammenhang vermochten auch HERING et al. (91) und ROST et al. (185) nicht zu finden.

Zusammenfassend muß also gesagt werden, daß gemäß unseren Erfahrungen die CEA-Bestimmung bei Hypernephromkranken auf Grund der niedrigen Positivitätsraten keinen brauchbaren klinischen Parameter für die Diagnose oder die Kontrolle des Therapieverlaufes darstellt, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, daß z.B. nach der Studie von HANSEN et al. (84) 19% der von ihnen untersuchten 620 gesunden Raucher, aber nur 3% der 892 gesunden nichtrauchenden Personen, CEA-Spiegel über der Normgrenze aufwiesen.

Bezüglich der Publikation von ROST et al. (185), die bei 87,5% ihrer Kranken, allerdings auch bei 33% der Kontrollpersonen erhöhte CEA-Werte gemessen hatten, erhebt sich die Frage nach der Definition einer Normgrenze. Diese wird in der Regel so angesetzt, daß 90 - 95% eines gesunden Kollektivs darunter liegen (z.B. 84). Insofern sind die von den Autoren für 87,5% ihrer Fälle angegebenen richtig positiven Resultate sicher viel zu hoch gegriffen. Dennoch sind die Differenzen zwischen unseren Befunden und denen von dieser und anderen Arbeitsgruppen (34, 73, 78) bemerkenswert. Eine bedeutende Rolle kommt hier wohl den unterschiedlichen Assay-Systemen im Zusammenhang mit der bekannten Heterogenität des Moleküls zu. Während z.B. viele Radioimmunoassays (z.B. HOFFMANN-LA ROCHE) auf CEA aus den Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms basieren und somit möglicherweise mehr ubiquitäres CEA erfassen, wurde das CEA des von uns eingesetzten Radioimmunoassays ausschließlich aus primären Kolonkarzinomen isoliert (126). Weiterhin hängen die Postitivitätsraten von der Spezifität der für den Assay benutzten Antiseren bzw. ihrer Kreuzreaktivität gegenüber mit CEA verwandten Substanzen (z.B. NCA), d.h. von der Qualität der Absorption, ab. Daß solche Faktoren die Ergebnisse von CEA-Konzentrationsbestimmungen durchaus erheblich beeinflussen können, zeigt z.B. die Arbeit von PLOW und EDGINGTON (175): nach Präparation ei-

ner besonders homogenen CEA-Fraktion aus Kolonkarzinomen (CEA-S) mittels aufwendiger Reinigungsverfahren und sehr spezifischer Antiseren vermochten sie bei Kolonkarzinomkranken im Vergleich zu Trägern anderer Malignome wesentlich höhere Inzidenzraten von pathologischen CEA-Spiegeln zu erzielen.

2.3.4.2.2 AFP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom

Die radioimmunologische AFP-Serumbestimmung eignet sich nach den bisher in der Literatur veröffentlichten Daten für die Diagnose sowie die Therapie- und Verlaufsbeurteilung von Patienten mit primärem Leberzellkarzinom und mit Keimzelltumoren (123). Seltene, geringere und mehr vorübergehende Erhöhungen des AFP-Spiegels fanden sich unter anderem hauptsächlich für in die Leber metastasierende Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Gallenwege und der Lunge. Über pathologische Serumkonzentrationen dieses Proteins im Zusammenhang mit einer hypernephroiden Erkrankung wurde jedoch unseres Wissens nur in einem Fall publiziert, in dem allerdings keine sekundäre Leberbeteiligung vorlag (173).
Auch unsere Ergebnisse lassen keine Korrelation zwischen vermehrter AFP-Produktion und karzinomatösen Prozessen der Niere erkennen. Nur zwei von 106 untersuchten Patienten wiesen Serumspiegel über der Normgrenze auf, bei einem der beiden war eine massive metastatische Absiedlung in die Leber bekannt. Nachdem aber weitere 17 Kranke mit sekundärer Leberbeteiligung normale Werte hatten, kommt der AFP-Bestimmung auch für die Erfassung dieses Patientengutes keine klinische Bedeutung zu.

2.3.4.2.3 Ferritinkonzentrationen im Serum von Patienten mit Nierenkarzinom

Eine wesentliche klinische Bedeutung erlangte Ferritin erst nach der Verfügbarkeit sensitiver radioimmunologischer Methoden, die einen Nachweis dieses Proteins auch im Blut gesunder Personen ermöglichte. Die hierfür ermittelten oberen Normwerte variieren je nach Arbeitsgruppe und angewandtem Assay zwischen 135 und

408 ng/ml bei Frauen bzw. 180 und 618 ng/ml bei Männern (136), ohne daß die Ursache des geschlechtsabhängigen Unterschiedes sicher erklärbar wäre. In der Regel werden heute 150 - 200 ng/ml als obere Normgrenze angesehen (136).
Inzwischen konnte eine Reihe von Krankheitsbildern mit Veränderungen der Ferritin-Serumkonzentrationen korreliert werden (136, 231): während eine Erniedrigung des Spiegels bisher lediglich für die Eisenmangelanämie beschrieben wurde, finden sich hohe Werte unter anderem bei Lebererkrankungen (Hepatitis, Zirrhose), die mit einer Nekrose von Hepatozyten (Ferritin-reich) und konsekutiver Ferritinfreisetzung einhergehen, desweiteren bei Eisenüberladung (z.B. Hämochromatose, Hämosiderose), Eisentherapie, aplastischer und hämolytischer Anämie, Thalassämie und vor allem auch Infektionen.
Eine besondere Bedeutung erlangte der Nachweis erhöhter Ferritinkonzentrationen im Zusammenhang mit vielen malignen Prozessen, z.B. verschiedenen akuten und chronischen Leukämieformen, M. HODGKIN, Mamma-, Lungen- und Ovarialkarzinom (s. unten).
Der Ursprung dieses Ferritins ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ganz klar und wohl auch nicht einheitlich. Mehrere Faktoren wie die bei Tumoren oft anzutreffende Anämie infolge einer Störung der Erythropoese (Eisenabstrom in das RES), entzündliche und nekrotische Prozesse in den Geschwülsten sowie Lebermetastasen, die allesamt die Serumkonzentration erheblich zu beeinflussen vermögen, müssen berücksichtigt werden. Daneben sind jedoch Tumorzellen auch in der Lage, Ferritin in vermehrtem Umfang zu synthetisieren, wie z.B. WHITE et al. (226) an leukämischen Leukozyten zeigte.
Eine weitere Schwierigkeit in der Interpretation von Ferritin-Spiegelerhöhungen bei Neoplasien basiert auf der bereits erwähnten Mikroheterogenität des Moleküls. Während die isoelektrischen Eigenschaften des normalen Serumferritins weitgehend jenen des Lebertyps gleichen, scheint das Blut von Malignom-Patienten zusätzlich oft größere Mengen an saureren Ferritinen zu enthalten (86), auch wenn einige Autoren (147, 228) solche Unterschiede für eine begrenzte Anzahl bösartiger Erkrankungen (akute Leukämien, Mammakarzinom) nicht feststellen konnten. Saure Ferritine jedoch werden durch einen üblichen kommerziel-

len, den basischen Typ messenden Radioimmunoassay nicht oder nur ungenügend erfaßt und machen die Verwendung spezieller Assays erforderlich (136).

Pathologische Serumferritinkonzentrationen wurden vorwiegend bei Neoplasien des lymphoretikulären Systems beobachtet (136, 147, 151). So ließen sich für akute Leukämieformen Inzidenzraten von über 90% mit Spiegelerhöhungen auf das durchschnittlich zehnfache des Normalwertes (136) ermitteln, die im Falle der akuten lymphatischen Leukämie eine deutliche Korrelation zum Therapieerfolg zeigten und deshalb möglicherweise als zusätzliches prognostisches Kriterium zur Beurteilung der Remissionsqualität geeignet sind (167). Weiterhin wiesen auch M. HODGKIN-Patienten in einem ähnlich hohen, vom Stadium der Erkrankung abhängigen Prozentsatz pathologische Serumkonzentrationen auf (bei Stadium III und IV fast 100%) (48, 136), während die Positivitätsraten bei anderen Malignomen durchwegs geringer liegen. Darunter werden die häufigsten pathologischen Spiegel für das Pankreaskarzinom (75%, N = 32) (151), das Lungenkarzinom (zwischen 62% und 77%) (48, 128, 151), das Ovarialkarzinom (67%, N = 109) (127), das Magenkarzinom (80%, N = 5) (151) und das Mammakarzinom (41%) (136) angegeben. Im Falle des Lungen- (76) und des Ovarialkarzinoms (127) fanden die Autoren darüberhinaus eine gewisse Korrelation zur klinischen Aktivität des neoplastischen Prozesses: regressive Verläufe tendierten eher zu normalen bzw. leicht erhöhten Serumkonzentrationen, Rezidive waren dagegen meist mit erneutem Spiegelanstieg verbunden.

Über Serumferritinbestimmungen bei Patienten mit Nierenkarzinom ist unseres Wissens bisher nicht berichtet worden. Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, hatten 72,4% der von uns präoperativ untersuchten Personen pathologische Ferritinwerte, eine signifikante Abhängigkeit von der Ausbreitung des Tumors war nicht zu ermitteln. Im Kollektiv der Spätkontrollen wiesen 41,7% der Rezidivfreien gegenüber 61,5% der Patienten mit progredienter Erkrankung erhöhte Serumspiegel auf. Dieser Unterschied war nur im parameterfreien U-Test statistisch signifikant, wobei hinzugefügt werden muß, daß alle Werte über 1000 ng/ml auf Patienten

mit Lebermetastasen sowie einem erniedrigten Hb entfielen, beides Faktoren, die die Serumferritinkonzentrationen von sich aus erheblich zu beeinflussen vermögen (136) und bei Interpretation der genannten Daten ebenso berücksichtigt werden müssen wie die Auswirkungen der Therapie (Operation, prä- und postoperative Bestrahlung). Letztere scheinen denn auch für den von uns in den meisten Fällen beobachteten ausgeprägten postoperativen Spiegelanstieg verantwortlich zu sein. Desweiteren ist zu bedenken, daß der von uns eingesetzte kommerzielle Assay saure Ferritine nicht oder nur ungenügend erfaßt und deshalb die Serumwerte von vielen Personen möglicherweise zu niedrig bestimmt wurden.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die für die vorliegende Arbeit untersuchte Fallzahl nicht ausreicht, um die klinische Relevanz von Ferritinbestimmungen im Serum Hypernephromkranker zu belegen. Hierzu sind umfangreichere Studien erforderlich. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch für eine Brauchbarkeit solcher Messungen als zusätzlicher Parameter einer Therapie- und Verlaufskontrolle. Ob dabei die Verwendung spezieller Assays für saure Ferritine signifikantere Ergebnisse liefern können, bleibt ebenfalls noch durch größere Studien zu beweisen.

2.3.4.3 Ausblick

Die Charakterisierung bzw. Isolierung Tumor-spezifischer oder -assoziierter Antigene mittels xenogener Antiseren wirft eine Reihe von methodisch bedingten Problemen auf, die die Beurteilung der erzielten Daten oft erheblich erschweren oder gar unmöglich machen. So lassen sich auf Grund der bereits erwähnten Tatsache, daß viele dieser Antiseren Antikörper gegen normale, individualspezifische Antigene enthalten (s. S. 36 und S. 99), z.B. die Ergebnisse von TEICHMANN et al. (214) (szintigraphischer Nachweis von Metastasen mittels Tumor-lokalisierender Antikörper, s. S. 36) auch als Nachweis solcher individualspezifischer Antigene interpretieren. Die Autoren hatten nämlich zur Immunisierung der Kaninchen das Hypernephrom der Patientin verwandt, der sie dann die gereinigte Antikörper-Präparation

spritzten, jedoch die Absorption der Antiseren und deren Überprüfung mit gepoolten normalen Nierenextrakten durchgeführt.

Ein weiteres Problem dieser Technik stellt die Kreuzreaktivität dar, die vor allem durch die Forschung über CEA und "CEA-like substances" gut dokumentiert ist (68, 69, 111). Tumor-assoziierte Antigene besitzen neben tumorspezifischen auch antigene Determinanten, die sie mit Proteinen des korrespondierenden Normalgewebes homologer und heterologer Herkunft und sogar mit Makromolekülen aus anderen Organen gemeinsam haben (68, 111). Somit können Antikörper, die gegen gemeinsame Determinanten verschiedener Substanzen gebildet wurden, eine vollständige Identität dieser Moleküle vortäuschen. Darüberhinaus wird ein tumorspezifisches Antigen durch solche Antiseren auch im Normalgewebe "nachgewiesen" und deswegen nicht "erkannt" (111).
Nun läßt sich die Kreuzreaktivität dieses Antiserumtyps, der nach Immunisierung mit gereinigtem Antigen wahrscheinlich weitaus häufiger erzielt wird als der monospezifische, gegen tumorspezifische Gruppen gerichtete Typ (111), durch ausgiebige Absorption beseitigen (68), jedoch meist mit der Konsequenz eines zu niedrigen spezifischen Antikörper-Titers.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß es bislang unter Anwendung der beschriebenen Methodik nicht gelungen ist, tumorspezifische Antigene bzw. tumorspezifische Determinanten bereits bekannter Tumor-assoziierter Antigene nachzuweisen (111). Neue Impulse für die Tumorantigen-Forschung erhofft man sich deswegen von einer noch relativ jungen Technik, nämlich der Hybridisierung von Myelomzellen mit Antikörper-produzierenden Zellen (monoklonale Antikörper): die Verfügbarkeit größerer Mengen von absolut monospezifischen (spezifisch für eine einzige antigene Determinante unabhängig von der Komplexität des Antigens), standardisierten Antikörper-Präparationen (92).

3 Z U S A M M E N F A S S U N G

Gepoolte Proben von Adenokarzinomen der Niere wurden unter Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden (saline und PCA-Extraktion) verarbeitet und die entsprechenden Gewebspräparationen mittels Gelfiltration (Sepharose 6B, Sephadex G 200 und G 100) fraktioniert. Kaninchen wurden mit Gesamt-Extrakt oder chromatographierten Einzelfraktionen immunisiert und die so erhaltenen Antiseren nach Absorption mit lyophilisiertem Normalserum und Erythrozyten der Blutgruppe AB und 0 auf Tumor-assoziierte Antigene untersucht. Hierbei konnten folgende Proteine entdeckt werden:

- in salinen Hypernephrom- und Normalgewebsextrakten ein mit Ferritin kreuzreagierendes Antigen im Molekulargewichtsbereich von 2×10^5 - 1×10^6 d, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Isoferritin handelt,
- nur in salinen Hypernephromextrakten ein mit Lactoferrin kreuzreagierendes Antigen mit einem Molekulargewicht zwischen 2×10^5 und 1×10^6 d,
- ein nicht näher identifiziertes niedermolekulares Protein (um 60 000 d), dem auf Grund seines Vorkommens in allen Gewebspräparationen keine besondere Bedeutung zukommt.

Die Bestimmung von AFP und CEA in den Seren von 106 bzw. 107 Nierenkarzinom-Patienten mittels im Arbeitslabor entwickelter Radioimmunoassays erbrachte im Fall von AFP nur zwei pathologische Werte und im Fall von CEA eine Positivitätsrate von 11%, die jedoch mit dem klinischen Stadium der Erkrankung nicht korrelierbar war.

Die bei 54 Hypernephromkranken durchgeführten radioimmunometrischen Serum-Ferritinmessungen (RIA-gnost Ferritin, Fa. BEHRING-WERKE AG) ergaben für 72,4% Erhöhungen des Spiegels über 250 bis 3033 ng/ml. Von 25 Personen, die wegen eines früher operativ behandelten Nierenkarzinoms unter ständiger Kontrolle standen, wiesen die Rezidiv- und Metastasenfreien gegenüber den Pa-

tienten mit progredienter Erkrankung signifikant niedrigere Serumkonzentrationen auf. Auch wenn diese Fallzahlen nicht ausreichen, um die klinische Relevanz von Serumferritinbestimmungen bei Hypernephromkranken zu belegen, sprechen die Ergebnisse doch für ihre Brauchbarkeit als Kontrollparameter des Krankheitsverlaufes unter zytostatischer und Radiotherapie.

4 L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ACKERMANN, R.:
Tumour-associated antibodies against renal cell carcinomas detected by immunofluorescence.
Eur. Urol. 1: 154 (1975)

2. Affinity chromatography. Principles and methods.
Broschüre der Fa. PHARMACIA, Uppsala, Schweden (1979)

3. ALEXANDER, P.:
Foetal "antigens" in cancer.
Nature 235: 137 (1972)

4. ALEXANDER, P.:
Escape from immune destruction of the host through shedding of surface antigens. Is this a characteristic shared by malignant and embryonic cells?
Cancer Res. 34: 2077 (1974)

5. AXEN, R., J. PORATH and S. ERNBACK:
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature 214: 1302 (1967)

6. BAGSHAWE, K. D.:
Tumour-associated antigens.
Br. med. Bull. 30: 68 (1974)

7. BAKER, E. N., and S. V. RUMBALL:
Crystallographic data for human lactoferrin.
J. Mol. Biol. 111: 207 (1977)

8. BALLAS, K., und H. PENNEKAMP:
Tumoren des Urogenitalsystems.
Aus SÖKELAND, J.: Kompendium urologischer Erkrankungen, S. 59.
Krüger-Verlag, Dortmund (1976)

9. BANDHAUER, K.:
Immunologische Probleme bei Nierenkarzinomen des Menschen.
Aus BOCK/DOLD: Krebsforschung und Krebsbekämpfung, Bd. 6, S. 72.
Urban und Schwarzenberg (1967)

10. BAUER, H.:
Virion and tumor cell antigens of C-type RNA-tumor viruses.
Adv. Cancer Res. 20: 275 (1974)

11. BENDE, H.:
Affinitäts-Chromatographie.
Chemie unserer Zeit 8: 17 (1974)

12. BENDIXEN, G., M. SÖBORG:
Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity.
Acta Med. Scand. 181: 247 (1967)

13. BENNET. R. M., and C. MOHLA:
A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: variations with age, sex, and disease.
J. Lab. Clin. Med. 88: 156 (1976)

14. BENNET, R. M., and T. KOKOCINSKI:
Lactoferrin content of peripheral blood cells.
Br. J. Haematol. 39: 509 (1979)

15. BENNINGTON, J. L., and F. A. LAUBSCHER:
Epidemiologic studies on carcinoma of the kidney - Association of renal adenocarcinoma with smoking.
Cancer 21: 1069 (1968)

16. BENNINGTON, J. L.:
Cancer of the kidney - etiology, epidemiology, and pathology.
Cancer 32: 1017 (1973)

17. BERGSTRAND, C. G., B. CZAR:
Demonstration of a new protein fraction in serum from human fetus.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 8: 174 (1956)

18. BICHLER, K. H., F. PORZOLT und C. KIRCHNER:
Serumeiweißbild beim hypernephroiden Karzinom.
Urol. int. 29: 329 (1974)

19. BICHLER, K. H., W. AX and C. TAUTZ:
Cell-mediated immunity in patients with renal adenocarcinoma.
Eur. Urol. 1: 231 (1975)

20. BICHLER, K. H., und C. P. SODOMANN:
Antikörper gegen fetorenales Antigen im Serum von Patienten mit hypernephroiden Karzinomen.
Akt. Urol. 7: 25 (1976)

21. BLOOM, E. T., R. C. OSSORIO and S. A. BROSMAN:
Cell-mediated cytotoxicity against human bladder cancer.
Int. J. Cancer 14: 326 (1974)

22. BLOOM, H. J. G.:
Hormone-induced and spontaneous regression of metastatic renal cancer.
Cancer 32: 1066 (1973)

23. BLUARD-DECONINCK, J.-M., J. WILLIAMS, R. W. EVANS, J. VAN SNICK, P. A. OSINSKI and P. L. MASSON:
Iron-binding fragments from the N-terminal and C-terminal regions of human lactoferrin.
Biochem. J. 171: 321 (1978)

24. BOEMINGHAUS, F., und G. WIENERT:
Hypernephroide Nierenkarzinome.
Dtsch. Med. Wschr. 97: 1035 (1972)

25. BOHLE, A.:
Niere und harnableitende Organe.
Aus EDER, M. und P. GEDIGK: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie, 29. Aufl., S. 617.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1974)

26. BOYSE, E. A., and L. J. OLD:
The invitation to surveillance.
Aus R. T. SMITH and M. LANDY: Immune surveillance.
Academic Press, New York: 5 (1970)

27. BROSMAN, S., M. HAUSMAN and S. J. SHACKS:
Studies on the immune status of patients with renal adenocarcinoma.
J. Urol. 114: 375 (1975)

28. BRÜHL, P., W. SCHEEF, H. ALBERT, E. BÜCHELER:
Hypernephroides Nierenkarzinom.
Dtsch. Ärztebl. 41: 2919 (1974)

29. BULLEN, J. J., and J. A. ARMSTRONG:
The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes.
Immunology 36: 781 (1979)

30. BURNET, F. M.:
The concept of immunological surveillance.
Progr. Exp. Tumor Res. 13: 1 (1970)

31. BYERS, V. S., and R. W. BALDWIN:
Tumor Immunology.
Aus H. H. FUDENBERG: Basic and clinical immunology, 3rd edition, p. 296.
Lange Medical Publications, California (1980)

32. CASTELLANOS, R. D., B. S. ARON and A. T. EVANS:
Renal adenocarcinoma in children: indicence, therapy and prognosis.
J. Urol. 111: 534 (1974)

33. CATALONA, W. J., P. B. CHRETIEN and E. E. TRAHAN:
Abnormalities of cell-mediated immunocompetence in genitourinary cancer.
J. Urol. 111: 229 (1974)

34. CHU, T. M., S. K. SHUKLA, A. O. MITTLEMAN and G. P. MURPHY:
Plasma carcinoembryonic antigen in renal cell carcinoma patients.
J. Urol. 111: 742 (1974)

35. COLE, A. T., I. AVIS, F. A. FRIED and F. AVIS:
Cell-mediated immunity in renal cell carcinoma - preliminary report.
J. Urol. 115: 234 (1976)

36. COLOMB, E., C. PIANETTA, J. P. ESTEVENON, O. GUY, C. FIGARELLA and H. SARLES:
Lactoferrin in human pancreas. Immunohistological localization in normal and pathological pancreatic tissues.
Digestion 14: 242 (1976)

37. CONSDEN, R., A. H. GORDON and A. J. P. MARTIN:
Biochem. J. 40: 33 (1946), zit. nach 112

38. COOMBES, R. C., R. R. HALL, D. J. R. LAURENCE and A. M. NEVILLE:
Urinary carcinembryonic antigen (CEA)-like molecules and urothelial malignancy: a clinical appraisal.
Br. J. Cancer 31: 135 (1975)

39. COX, T. M., J. MAZURIER, G. SPIK, J. MONTREUIL, and T. J. PETERS:
Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine.
Biochim. Biophys. Acta 588: 120 (1980)

40. CRAGG, S. J., A. JAKOBS, D. H. PARRY, M. WAGSTAFF, and M. WORWOOD:
Isoferritin in acute leukaemia.
Br. J. Cancer 35: 635 (1977)

41. CUATRECASAS, P., and C. B. ANFINSEN:
Affinity chromatography.
Ann. Rev. Biochem. 40: 259 (1971)

42. CUMMINGS, K. B., J. B. PETER, and J. J. KAUFMAN:
Cell-mediated immunity to tumor antigens in patients with renal cell carcinoma.
J. Urol. 110: 31 (1973)

43. CURLING, J. M.:
The use of Sephadex in the separation, purification and characterization of biological materials.
Aus Exp. in Physiol. Biochem. 3: 417
Ed. G. A. KERKUT, Academic Press London-New York (1970)

44. CURRIE, G.:
The role of circulating antigen as an inhibitor of tumour immunity in man.
Br. J. Cancer 28, Suppl. 1: 153 (1973)

45. DEKERNION, J. B., K. P. RAMMING and R. K. GUPTA:
The detection and clinical significance of antibodies to tumor-associated antigens in patients with renal cell carcinoma.
J. Urol. 122: 300 (1979)

46. DETERMANN, H.:
Gel chromatography.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1968)

47. DOBRIN, R. S., F. E. KNUDSON and A. F. MICHAEL:
The secretory immune system and renal disease.
Clin. exp. Immunol. 21: 318 (1975)

48. DÖRNER, M., P. DRINGS:
Isoferritine und ihre mögliche Bedeutung als Tumor-Marker.
Aus J. P. KALTWASSER und E. WERNER: Serumferritin, S. 248.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1980)

49. DRYSDALE, J. W., and R. M. SINGER:
Carcinofetal human isoferritins in placenta and Hela cells.
Cancer Res. 34: 3352 (1974)

50. EISENBERGER, F., und A. G. HOFSTETTER:
Urologie.
Aus HEBERER, G., W. KÖHLE, H. TSCHERNE: Chirurgie, S. 530.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1977)

51. ELHILALI, M. M., and S. K. NAYAK:
Immunologic evaluation of human renal cell carcinoma: in vitro studies.
Invest. Urol. 13: 60 (1975)

52. EVERSON, T. C., and W. M. COLE:
Spontaneous regression of cancer.
W. B. Saunders Co. Philadelphia, p. 11 (1966)

53. EVERSON, T. C.:
Spontaneous regression of cancer.
Aus J. M. ARIEL (Ed.): Progress in clinical cancer, Vol. 3.
Grune & Stratton, New York (1967)

54. FEDAIL, S. S., R. F. HARVEY, P. R. SALMON, and A. E. READ:
Radioimmunoassay of lactoferrin in pancreatic juice as a test for pancreatic diseases.
Lancet 1: 181 (1978)

55. FIGARELLA, C., J. P. ESTEVENON, H. SARLES:
Measurement of lactoferrin in pancreatic juice.
Lancet 1: 1105 (1978)

56. FISHMAN, M., and F. L. ADLER:
The role of macrophage RNA in the immune response.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 343 (1967)

57. FISHMAN, W. H., N. R. INGLIS, S. GREEN, C. L. ANSTISS, N. K. GOSH, A. E. REIF, F. RUSTIGIAN, M. J. KRANT, and L. L. STOLBACH:
Immunology and biochemistry of REGAN isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer.
Nature 219: 697 (1968)

58. FISHMAN, W. H., N. R. INGLIS, L. L. STOLBACH, M. J. KRANT:
A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin.
Cancer Res. 28: 150 (1968)

59. FOLEY, E. J.:
Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin.
Cancer Res. 13: 835 (1953)

60. FORBES, A. P., J. R. LAKE and K. J. BLOCH:
Circulating antibody to renal collecting ducts in patients with hepatoma or renal-cell carcinoma.
Clin. exp. Immunol. 26: 426 (1976)

61. FORTNER, J. G., and M. H. SHIU:
Organ transplantation and cancer.
Surg. Clin. North Am. 54: 871 (1974)

62. GALCO, A., J. P. CASADO, R. TALAVERA:
Démonstration dans le sérum du foetus humain d'une nouvelle fraction protéique au moyen de l'électrophorèse sur papier.
Arch. franç. Pédiat. 16: 954 (1959)

63. GELDER, F. B., C. REESE, A. R. MOOSSA, and R. L. HUNTER:
Pancreatic oncofetal antigen.
Aus R. B. HERBERMAN and K. R. McINTIRE: Immunodiagnosis of Cancer 1, p. 357.
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1979)

64. GELOTTE, B., and J. PORATH:
Gel filtration.
Aus E. HEFTMANN (ed.): Chromatography, 2nd ed..
Reinhold Publ. Corp.

65. GHOSE, T., P. BELITSKY, J. TAI and D. T. JANIGAN:
Production and characterization of xenogeneic antisera to a human renal cell carcinoma-associated antigen.
JNCI 63: 301 (1979)

66. GOLD, P., S. O. FREEDMAN:
Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques.
J. exp. Med. 121: 439 (1965)

67. GOLD, P., S. O. FREEDMAN:
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J. exp. Med. 122: 467 (1965)

68. GOLD, P., S. O. FREEDMAN, and J. SHUSTER:
Carcinoembryonic antigen.
Aus R. B. HERBERMAN and K. R. McINTIRE: Immunodiagnosis of Cancer 1, p. 147.
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1979)

69. GOLDENBERG, D. M., F. J. PRIMUS, and F. DE LAND:
Tumor detection and localisation with purified antibodies to carcinoembryonic antigen.
Aus R. B. HERBERMAN and K. R. McINTIRE: Immunodiagnosis of Cancer 1, p. 265.
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1979)

70. GRABAR, P., et C. A. WILLIAMS:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines, application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 10: 193 (1953)

71. GRABAR, P., et C. A. WILLIAMS:
Etudes sur les protéines à l'aide de méthodes immunochimiques.
Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 36: 65 (1954)

72. GRABAR, P.:
Introductory remarks on foetal proteins and their re-appearance in tumors.
Prot. biol. Fluids 18: 201 (1971)

73. GRAF, C., und P. J. GROB:
Bestimmung des karzinoembryonalen Antigens im medizinischen Alltag.
Schweiz. med. Wschr. 107: 1534 (1977)

74. GRASSMANN, W., K. HANNIG und M. KNEDEL:
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier.
Dtsch. Med. Wschr. 11: 333 (1951)

75. GRAWITZ, P.:
Virchows Arch. path. Anat. 93: 39 (1883)

76. GROPP, C., K. HAVEMANN, F.-G. LEHMANN:
Serum ferritin levels in patients with lung cancer before and during therapy and in comparison to CEA determinations.
Aus F.-G. LEHMANN (ed.): Carcino-Embryonic Proteins, Vol. II, p. 451.
Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1979)

77. GUERIN, M., I. CHOUROULINKOW, and M. R. RIVIERE:
Experimental kidney tumors.
Aus C. ROUILLER and R. F. MULLER: The Kidney, Vol. 2, p. 199.
Academic Press, New York (1969)

78. GUINAN, P., A. DUBIN, I. BUSH, H. ALSHEIK, and R. J. ABLIN:
The CEA test in urologic cancer: an evaluation and a review.
Oncology 32: 158 (1975)

79. HAKALA, T. R., P. H. LANGE, A. CASTRO, A. ELLIOTT, and E. E. FRALEY:
Cell mediated cytotoxicity against human transitional cell carcinomas of the genitourinary tract.
Cancer 34: 1929 (1974)

80. HALBRECHT, I., C. KLIBANSKI:
Identification of a new normal embryonic haemoglobin.
Nature 178: 794 (1956)

81. HALLGREN, M. M., C. E. BUCKLEY III, V. A. GILBERTSON, and E. J. YUNIS:
Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins, and autoantibodies in aging humans.
J. Immunol. 111: 1101 (1973)

82. HAKALA, T. R., A. E. CASTRO, A. Y. ELLIOTT, and E. E. FRALEY:
Humoral cytotoxicity in human renal cell carcinoma.
Invest. Urol. 11: 405 (1974)

83. HANNIG, K.:
Papierelektrophorese in der Eiweißchemie.
Hoppe-Seyler/Thierfelder 4: 136 (1960)

84. HANSEN, H. J., J. J. SNYDER, E. MILLER, J. V. VANDEVOORDE, O. N. MILLER, L. R. HINES, and J. J. BURNS:
Carcinoembryonic antigen (CEA) assay: A laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer.
Human Pathol. 5: 139 (1974)

85. HARTHUS, H.-P.:
Lymphozytensensibilisierung in Tumor-tragenden Ratten: Untersuchungen mit dem Elektrophorese-Mobilitäts-Test.
Inaugural-Dissertation, Marburg (1979)

86. HASARD, J. T., M. YOKOTA, P. ARIOSO, J. W. DRYSDALE:
Immunologic differences in human isoferritins - implications for immunologic quantitation of serum ferritin.
Blood 49: 139 (1977)

87. HAUPT, H., und S. BAUDNER:
Isolierung und Kristallisation von Lactoferrin aus Human-Kolostrum.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354: 944 (1973)

88. HELLSTRÖM, K. E., and I. HELLSTRÖM:
Cellular immunity against tumour antigens.
Adv. Cancer Res. 12: 167 (1969)

89. HELLSTRÖM, I., K. E. HELLSTRÖM, H. O. SJÖGREN and G. A. WARNER:
Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types.
Int. J. Cancer 7: 1 (1971)

90. HEMSTREET, G. P., J. R. DAWSON, H. F. SEIGLER:
Tumor membrane lymphocyte stimulation assay in patients with renal cell carcinoma.
Cancer Res. 38: 1447 (1978)

91. HERING, H., F. J. HERING und W. WEIDNER:
CEA-Bestimmung in Urin und Plasma bei Patienten mit Tumoren des Urogenitaltraktes.
Urologe A 15: 300 (1976)

92. HERZENBERG, L. A., L. A. HERZENBERG and C. MILSTEIN:
Cell hybrids of myelomas with antibody forming cells and T-lymphomas with T cells: A new means of making large amounts of monoclonal antibodies and a potential means of making large numbers of cells carrying out specific T cell functions.
Aus D. M. WEIR: Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2, 3rd ed., Kap. 25.
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)

93. HIJMANS, W., H. R. SCHUIT, and F. KLEIN:
An immunofluorescent procedure for the detection of intracellular immunoglobulins.
Clin. exp. Immunol. 4: 457 (1969)

94. HIRSZFELD, L., W. HALBER und J. LASKOWSKI:
Untersuchungen über die serologischen Eigenschaften der Gewebe. II. Über serologische Eigenschaften der Neubildungen.
Z. Immun.-Forsch. exp. Ther. 64: 81 (1929)

95. HOFSTETTER, A.:
Tumor-Klassifikation nach dem TNM-System im Bereich des Urogenitaltraktes. Folge 1: Adenokarzinom der Niere.
Fortschr. Med. 96: 382 (1978)

96. HOLLAND, J. M.:
Cancer of the kidney - Natural history and staging.
Cancer 32: 1030 (1973)

97. HUNTER, W. M.:
Radioimmunoassay.
Aus D. M. WEIR: Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, 3rd ed., Kap. 14.
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)

98. JONES, B. M., and M. WORWOOD:
An immunoradiometric assay for the acidic ferritin of human heart: application to human tissues, cells and serum.
Clin. Chim. Acta 85: 81 (1978)

99. JONES, L. W.:
Letter: Glomeruli with IgM-tumor antigen complex.
N. Engl. J. Med. 293: 559 (1975)

100. JONES, L. W., A. LEVIN, and H. H. FUDENBERG:
Glomerular antigen complexes associated with transitional cell carcinoma.
Surg. Gynecol. Obstet. 140: 896 (1975)

101. KHOO, S. K., N. L. WARNER, J. T. LIE, I. R. MACKAY:
Carcinoembryonic antigenic activity of tissue extracts: A quantitative study of malignant and benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult and fetal organs.
Int. J. Cancer 11: 681 (1973)

102. KIRKMAN, H.:
Oestrogen-induced tumours of the kidney.
Natl. Cancer Inst. Monogr. 1. Washington, U.S. Govt. Printing Office (1959)

103. KISTLER, G. S., und W. SONNABEND:
Antikörper gegen ein fetorenales Antigen in Hepatitis-B-Patienten, Trägern von Nierentumoren und gesunden Individuen.
Schweiz. med. Wschr. 104: 485 (1974)

104. KJAER, M.:
Brief Reports: The capillary tube leucocyte migration technique (LMT) as a method for detection of serum inhibiting activity of tumour-directed, cellular hypersensitivity in patients with renal carcinomas.
Acta path. microbiol. scand. Section B, 82: 294 (1974)

105. KJAER, M.:
In vitro demonstration of cellular hypersensitivity to tumour antigens by means of the leucocyte migration technique in patients with renal carcinoma.
Eur. J. Cancer 10: 523 (1974)

106. KJAER, M.:
Dose-related effect of tumour extract on in vitro migration of leucocytes from patients with renal carcinoma.
Eur. J. Cancer 11: 281 (1975)

107. KJAER, M.:
Effect of leucocyte washings on cellular immunity to human renal carcinoma.
Eur. J. Cancer 12: 783 (1976)

108. KJAER, M.:
Prognostic value of tumour-directed, cellmediated hypersensitivity detected by means of leucocyte migration technique in patients with renal carcinoma.
Eur. J. Cancer 12: 889 (1976)

109. KJAER, M., G. BENDIXEN:
Discussion paper: Tumor-directed cellular hypersensitivity detected by leucocyte migration in patients with renal carcinoma.
Ann. Ny. Acad. Sci. 276: 260 (1976)

110. KLEIST, S. v., P. BURTIN:
Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors.
Cancer Res. 29: 1961 (1969)

111. KLEIST, S. v., and P. BURTIN:
Antigens cross-reacting with CEA.
Aus R. B. HERBERMAN and K. R. McINTIRE: Immunodiagnosis of Cancer 1, p. 322.
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1979)

112. KNEDEL, M., und F. SPERL:
Über ein präparatives Elektrophorese-Verfahren mit Kartonpapier als Trägermaterial.
Blut 5: 65 (1959)

113. KNEDEL, M., und A. FATEH-MOGHADAM:
Methoden und Ergebnisse der Säulenchromatographie in der klinischen Protein-Chemie.
Ergebn. Labor-Med. 2: 137 (1965)

114. KNEDEL, M., und A. FATEH-MOGHADAM:
Die Gradientenelutions-Chromatographie.
"G-I-T" (Darmstadt): 675 (1965)

115. KOHN, J.:
Clin. Chim. Acta 2: 297 (1957)

116. KOHN, J.:
Ärztl. Laboratorium 10: 234 (1964)

117. KOHN, J.:
Ärztl. Laboratorium 10: 269 (1964)

118. KOHN, J., M. WILCHEK:
A colorimetric method for monitoring activation of Sepharose by cyanogen bromide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84: 7 (1978)

119. KRUPEY, J., T. WILSON, S. O. FREEDMAN and P. GOLD:
The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue.
Immunochem. 9: 617 (1972)

120. KUMAR, S., G. TAYLOR, J. K. STEWARD, M. A. WAGHE and D. PEARSON:
Cellular immunity in WILMS' tumour and neuroblastoma.
Int. J. Cancer 10: 36 (1972)

121. KUMAR, S., M. WAGHE and G. TAYLOR:
Tumour-specific antibodies reactive with cell-surface antigens in children with WILMS' tumour.
Int. J. Cancer 19: 351 (1977)

122. KURTH, R., and others:
Cell surface antigens induced by RNA tumour viruses.
Nature 279: 197 (1979)

123. LAMERZ, R., und A. FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene. I. Alpha-Fetoprotein.
Klin. Wschr. 53: 147 (1975)

124. LAMERZ, R., und A. FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene. II. Carcinoembryonales Antigen (CEA).
Klin. Wschr. 53: 193 (1975)

125. LAMERZ, R., und A. FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene. III. Andere carcinofetale Antigene.
Klin. Wschr. 53: 403 (1975)

126. LAMERZ, R.:
Karzinofetale Antigene: Isolierung, Nachweis und klinische Bedeutung.
Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi, München (1975)

127. LAMERZ, R., G. SCHNABL, G. STEIN, H. J. KÜMPER, A. BRANDT:
Immunological investigations in ovarian cancer.
Aus F.-G. LEHMANN: Carcino-Embryonic Proteins, Vol. II, p. 509.
Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1979)

128. LAMERZ, R., R. GIRG, H. HENNEKE, G. HORKA, E. SEGURA:
Immunological investigations in lung cancer.
Aus F.-G. LEHMANN: Carcino-Embryonic Proteins, Vol. II, p. 559.
Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1979)

129. LEBLANC, P. A., S. M. TAFFET, F. A. FRIED and F. P. AVIS:
Staphylococcal protein assay for detection of antibody directed at renal cancer cells.
J. Urol. 121: 724 (1979)

130. LEE, J. C. K., and G. W. RICHTER:
Distinctive properties of ferritin from the Reuber H-35 rat hepatoma.
Cancer Res. 31: 566 (1971)

131. LEWIS, M. G., L. W. LOUGHRIDGE and T. M. PHILLIPS:
Immunological studies in nephrotic syndrome associated with extrarenal malignant disease.
Lancet 2: 134 (1971)

132. LEWIS, V. M., J. J. TWOMEY, P. BEALMEAR, G. GOLDSTEIN, and R. A. GOOD:
Age, thymic involution and circulating thymic hormone activity.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 145 (1978)

133. MAKINODAN, T.:
Mechanism, prevention and restoration of immunologic aging.
Birth Defects 24:197 (1978)

134. MALMQUIST, J.:
Lactoferrin in haematology.
Scand. J. Haematol. 21: 5 (1978)

135. MARCUS, D. M., and N. ZINBERG:
Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoadsorbents.
Arch. Biochem. Biophys. 162: 493 (1974)

136. MARCUS, D. M., N. ZINBERG and I. LISTOWSKY:
Ferritin.
Aus R. B. HERBERMAN and K. R. McINTIRE: Immunodiagnosis of Cancer 1, p. 473.
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1979)

137. MARTINEZ-PINEIRO, J. A., P. MUNTANOLA and L. HIDALGO:
Immunological evaluation in patients with urological cancers.
Eur. Urol. 3: 159 (1977)

138. MASON, C. Y., and C. R. TAYLOR:
Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues.
J. clin. Pathol. 31: 316 (1978)

139. MAUGH, T.:
Fetal antigens: A biochemical assay for cancer?
Science 184: 147 (1974)

140. McCUNE, C. S., W. B. PATTERSON and E. C. HENSHAW:
Active specific immunotherapy with tumor cells and Corynebacterium parvum. A phase study.
Cancer 43: 1619 (1979)

141. McEWAN, F., and L. G. PETTY:
Onconenicity of immunosuppressive drugs.
Lancet 1: 326 (1972)

142. McLAUGHLIN, A. P., W. O. KESSLER, K. TRIMAN and R. F. GITTES:
Immunologic competence in patients with urologic cancer.
J. Urol. 111: 233 (1974)

143. McLAUGHLIN, A. P., W. O. KESSLER and R. F. GITTES:
The dissociation between endocrine carcinogenesis and tumor antigenicity.
Invest. Urol. 12: 83 (1974)

144. MICHAELIS, L.:
Der Acetat-Veronal-Puffer.
Biochem. Z. 234: 139 (1931)

145. MONTIE, J. E., R. A. STRAFFON, S. D. DEODHAR, B. BARNA:
In vitro assessment of cell-mediated immunity in patients with renal cell carcinoma.
J. Urol. 115: 239 (1976)

146. MORALES, A., and D. EIDINGER:
Immune reactivity in renal cancer: a sequential study.
J. Urol. 115: 510 (1976)

147. MUNRO, H. N., and M. C. LINDER:
Ferritin: Structure, biosynthesis, and role in iron metabolism.
Physiol. Rev. 58: 31 (1978)

148. NETTER, F. H.:
Farbatlanten der Medizin (The Ciba Collection of Medical Illustrations). Bd. 2: Niere und Harnwege.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1976)

149. NICOLSON, G. L.:
Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components.
Biochim. Biophys. Acta 457: 57 (1976)

150. NICOLSON, G. L.:
Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy.
Biochim. Biophys. Acta 458: 1 (1976)

151. NIITSU, Y., N. WATANABE, J. KOSEKI, J. OIKAWA, Y. KADONO, I. ISHII, Y. GOTO, Y. ONODERA, and I. URUSHIZAKA:
Clinical evaluation of serum ferritin for serodiagnosis of cancer.
Aus F.-G. LEHMANN (ed.): Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, p. 279.
Elsevier/North Holland, Biomedical Press (1979)

152. NISHI, S., and H. HIRAI:
Purification of human, dog and rabbit alpha-fetoprotein by immunoadsorbents of Sepharose coupled with anti-human alpha-fetoprotein.
Biochim. Biophys. Acta 278:293 (1972)

153. OLOFSSON, T., I. OLSSON, P. VENGE and B. ELGEFORS:
Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia.
Scand. J. Haematol. 18: 73 (1977)

154. OLOFSSON, T., I. OLSSON and P. VENGE:
Myeloperoxidase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukaemia.
Scand. J. Haematol. 18: 113 (1977)

155. OLSSON, I., T. OLOFSSON, K. OHLSSON and A. GUSTAVSSON:
Serum and plasma myeloperoxidase, elastase and lactoferrin content in acute myeloid leukaemia.
Scand. J. Haematol. 22: 397 (1979)

156. O'TOOLE, C., P. PERLMANN, B. UNSGAARD, G. MOBERGER and F. EDSMYR:
Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma.
I. Correlation to clinical stage and radiotherapy.
Int. J. Cancer 10: 77 (1972)

157. O'TOOLE, C., P. PERLMANN, B. UNSGAARD, L. E. ALMGARD, B. JOHANSSON, G. MOBERGER and F. EDSMYR:
Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma.
II. Effect of surgery and preoperative irradiation.
Int. J. Cancer 10: 92 (1972)

158. O'TOOLE, C.:
A ^{51}chromium isotope release assay for detecting cytotoxicity to human bladder carcinoma.
Int. J. Cancer 19: 324 (1977)

159. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)

160. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II.
Progress in Allergy 6: 3 (1962)

161. OZAWA, T., R. PLUSS, J. LACHER, E. BOEDECKER, S. GUGGENHEIM, W. HAMMOND, and R. McINTOSH:
Endogenous immune complex nephropathy associated with malignancy. I. Studies on the nature and immunopathogenic significance of glomerular bound antigen and antibody, isolation and characterization of tumor specific antigen and antibody and circulating immune complexes.
Q. J. Med. 44: 523 (1975)

162. PAPE, G. R., M. TROYE, and P. PERLMANN:
Characterization of cytolytic effector cells in peripheral blood of healthy individuals and cancer patients. I. Surface markers and K cell activity after separation of B cells and lymphocytes with Fc-receptors by column fractionation.
J. Immunol. 118: 1919 (1977)

163. PAPE, G. R., M. TROYE, and P. PERLMANN:
Characterization of cytolytic effector cells in peripheral blood of healthy individuals and cancer patients. II. Cytotoxicity to allogeneic or autochthonous tumor cells in tissue culture.
J. Immunol. 118: 1925 (1977)

164. PAPE, G. R., M. TROYE, B. AXELSSON, and P. PERLMANN:
Simultaneous occurrence of immunoglobulin-dependent and immunoglobulin-independent mechanisms in natural cytotoxicity of human lymphocytes.
J. Immunol. 122: 2251 (1979)

165. PAPPAS, A., G. SCHWARZE, K. KÖNIG, P. G. SCHEURLEN:
Tumorspezifische, zelluläre Immunreaktionen in vitro bei Patienten mit Hypernephrom.
Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 80: 1633 (1974)

166. PAPPAS, A., and G. SCHWARZE:
In vitro demonstration of cell-mediated immunity against human renal carcinoma assessed by the leukocyte migration assay.
Z. Immun.-Forsch. (Immunobiology) 148: 142 (1974)

167. PARRY, D. H., M. WORWOOD, and A. JACOBS:
Serum ferritin in acute leukaemia at presentation and during remission.
Br. Med. J. 1: 245 (1975)

168. PARRY, R. M., and E. M. BROWN:
Lactoferrin conformation and metal binding properties.
Adv. Exp. Med. Biol. 48: 141 (1975)

169. PATEL, N. P., R. W. LAVENGOOD:
Renal cell carcinoma: natural history and results of treatment.
J. Urol. 119: 722 (1978)

170. PAYNE, M., J. LEONARD, J. KING, S. N. BOOTH and P. W. DYKES:
An examination of the possible inter-relationships between serum concentrations of carcinoembryonic antigen and other glycoproteins.
Ann. Immunol. (Inst. Past.) 124C: 633 (1973)

171. PETERSON, E. A., and H. A. SOBER:
Chromatography of proteins. I. Cellulose ionexchange adsorbents.
J. Am. Chem. Soc. 78: 751 (1956)

172. PETERSON, E. A.:
Cellulosic ion exchangers.
Aus T. S. WORK (ed.): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.
Publ. North-Holland - Amsterdam - London (1970)

173. PIARD, A., J. P. MABILLE, R. PUTELAT:
Syndrome paranéoplastique à manifestations multiples révélateur d'un hypernéphrome avec présence d'alpha-fétoprotéine.
Sem. Hôp. Paris 49: 341 (1973)

174. PILCH, Y. H., and K. P. RAMMING:
Transfer of tumor immunity with ribonucleic acid.
Cancer 26: 630 (1970)

175. PLOW, E. F., and T. S. EDGINGTON:
Speciation of carcinoembryonic antigen and its immuno-diagnostic implications.
Aus R. B. HERBERMAN and K. R. McINTIRE: Immunodiagnosis of Cancer 1, p. 181.
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1979)

176. POORTMANS, J., and J. BIENENSTOCK:
Synthesis of immunoglobulins and 15 other proteins by diseased human kidneys.
Eur. J. clin. Invest. 5: 365 (1975)

177. POPELIER, G., und H. SION:
Das Vorkommen eines fetorenalen Antigens im Adenokarzinom der Niere.
Urol. int. 32: 373 (1977)

178. RAMMING, K. P., J. B. DEKERNION:
Immune RNA therapy for renal cell carcinoma - survival and immunologic monitoring.
Ann. Surg. 186: 459 (1977)

179. RENNER, H.:
Onko-fetale Antigene und Tumor-Immuntherapie.
Fortschr. Med. 92: 175 (1974)

180. RICHES, E.:
The natural history of renal tumours.
Aus: Tumours of Kidney and Ureter, p. 124.
The Williams and Wilkins Co. Baltimore (1964), zit. nach 35.

181. RICHTER, G. W.:
Comparison of ferritins of neoplasic and non-neoplastic human cells.
Nature 207: 616 (1965)

182. ROCKLIN, R. E.:
Products of activated lymphocytes: leucocyte inhibitory factor distinct from migration inhibitory factor.
J. Immunol. 112: 1461 (1974)

183. RODBARD, D., W. BRIDSON, and P. L. RAYFORD:
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J. Lab. Clin. Med. 74: 770 (1969)

184. ROSENBERG, S. A.:
Problems with the leukocyte migration inhibition technique in the study of human tumor immunity.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 37: 139 (1973)

185. ROST, A., U. KNEPPENBERG, P. ROST:
Wertigkeit des karzinoembryonalen Antigens (CEA) für die Diagnostik maligner Tumoren des Urogenitaltraktes.
Helv. chir. Acta 43: 271 (1976)

186. RULE, A. H., and C. GOLESKI-REILLY:
Carcinoembryonic antigen (CEA): separation of CEA-reacting molecules from tumor, fetal gut, meconium and normal colon.
Immunol. Comm. 2: 213 (1973)

187. RUTISHAUSER, G.:
Urologie.
Aus M. ALLGÖWER: Chirurgie, 2. Aufl., S. 558.
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1973)

188. SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethoden. 3. Aufl..
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1968)

189. SANDRITTER, W.:
Makropathologie. Lehrbuch und Atlas für Studierende und Ärzte. 2. Aufl..
Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1971)

190. SANDRITTER, W.:
Histopathologie. Lehrbuch und Atlas für Studierende und Ärzte. 5. Aufl..
Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1973)

191. SARCIONE, E. J., J. R. SMALLEY, M. J. LEMA and L. STUTZMAN:
Increased ferritin synthesis and release by HODGKIN's disease peripheral blood lymphocytes.
Int. J. Cancer 20: 339 (1977)

192. SCHAPIRA, F.:
Foetal enzyme patterns in cancer tissues.
Rev. Europ. Etud. clin. biol. 16: 205 (1971)

193. SCHEIDEGGER, J. J.:
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. All. 7: 103 (1955)

194. SCHWARZE, G., R. DIETZ and A. PAPPAS:
Studies on cellular immunity in patients with renal carcinoma: radiation-induced inhibition of leukocyte migration.
Eur. J. Cancer 15: 205 (1979)

195. SEPHADEX-Gel filtration in theory and practice (Broschüre).
Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Schweden (1979)

196. SILVERBERG, S. G., R. H. EVANS, and A. L. KOEHLER:
Clinical and pathologic features of initial metastatic presentations of renal cell carcinoma.
Cancer 5: 1126 (1969)

197. SIMON, C., und D. HARMS:
Krankheiten des Urogenitaltraktes.
Aus SIMON, C.: Klinische Pädiatrie, S. 261.
Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1973)

198. SINGER, S. J., and G. L. NICOLSON:
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids.
Science 175: 720 (1972)

199. SMITH, H. J., P. H. FIGARD, P. J. O'NEILL and M. GOCKEN:
Carcinoembryonic antigen (CEA): Radioimmunoassay using highly purified CEA and ^{125}I-CEA.
Res. Comm. in Chem. Path. Pharm. 5:573 (1973)

200. SOHNLE, P. G., S. E. LARSON, C. COLLINS-LECH, and A. R. GUANSING:
Failure of lymphokine-producing lymphocytes from aged humans to undergo activation by recall antigens.
J. Immunol. 124: 2169 (1980)

201. SOBER, H. A., F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF and E. A. PETERSON:
Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum proteins on anion-exchange cellulose.
J. Am. chem. Soc. 78: 756 (1956)

202. SOBER, H. A., and E. A. PETERSON:
Protein chromatography on ion exchange cellulose.
Fed. Proc. 17: 1116 (1958)

203. SÖKELAND, J.:
Nierentumoren.
Dtsch. Ärztebl. 9: 487 (1978)

204. SØRENSEN, M., and S. P. L. SØRENSEN:
The proteins in whey.
Compt. rend. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 23:55 (1939)

205. SORENSEN, T. B., KJAER, M.:
Agarose microdroplet leukocyte migration technique for detection of cell-mediated hypersensitivity to PPD and renal carcinoma antigen (Brief communication).
Clin. exp. Immunol. 30: 168 (1977)

206. STAUFFER, M. H.:
Nephrogenic hepatosplenomegaly (Abstract).
Gastroenterology 40: 649 (1961)

207. STJERNSWÄRD, J., L.-E. ALMGÅRD, S. FRANZÉN, T. v. SCHREEB and L. B. WADSTRÖM:
Tumour-distinctive cellular immunity to renal carcinoma.
Clin. exp. Immunol. 6: 963 (1970)

208. STONEHILL, E. H., A. BENDICH:
Retrogenetic expression: the reappearance of embryonal antigens in cancer cells.
Nature 228: 370 (1970)

209. STRÄULI, P.:
Neoplasien.
Aus W. SIEGENTHALER: Klinische Pathophysiologie, S. 1006.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1973)

210. STRATHMANN, H.:
Stofftrennung durch Druckfiltration mit semipermeablen Membranen.
"Chemie-Ingenieur-Technik", Zschr. f. Verfahrenstechnik, Techn. Chemie und Apparatewesen 42: 1095 (1970)

211. SUSSMAN, H. H., B. D. WEINTRAUB, S. W. ROSEN:
Relationship to ectopic placental phosphatase, to ectopic chorionic gonadotropin and placental lactogen: Discordance of three "markers" for cancer.
Cancer 33: 820 (1974)

212. TAKASUGI, M., and E. KLEIN:
A microassay for cell-mediated immunity.
Transplantation 9: 219 (1970)

213. TAKASUGI, M., M. R. MICKEY and P. I. TERASAKI:
Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells.
Cancer Res. 33: 2898 (1973)

214. TEICHMANN, B., und R. VOGT:
Isolierung tumorlokalisierender Antiköper mittels Immunosorbenzein. III. Isolierung von heterologen Antikörpern gegen Portiokarzinom und Hypernephrom des Menschen.
Arch. Geschwulstforsch. 43: 145 (1974)

215. THORN, G. W., R. D. ADAMS, E. BRAUNWALD, K. J. ISSELBACHER, and R. G. PETERSDORF:
HARRISON's Principles of Internal Medicine, 8. Ed..
"A Blakiston publication".
McGraw-Hill Book Company (1977)

216. TRUNIGER, B.:
Hämaturie, Pyurie, Proteinurie und Störungen der Diurese.
Aus R. HEGGLIN/W. SIEGENTHALER: Differentialdiagnose innerer Krankheiten, S. 593.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1975)

217. VELTRI, R. W., H. F. MENGOLI, P. E. MAXIM, S. WESTFALL, J. M. GOPO, C. W. HUANG, and P. M. SPRINKLE:
Isolation and identification of human lung tumor-associated antigens.
Cancer Res. 37: 1313 (1977)

218. VET, B. J. C. M. de, and J. van GOOL:
Lactoferrin and iron absorption in the small intestine.
Acta Med. Scand. 196: 393 (1975)

219. VICKERS, M. Jr.:
Serum haptoglobins: Preoperative detector of metastatic renal carcinoma.
J. Urol. 112: 310 (1974)

220. VIERUCCI, A., W. T. LONDON, B. S. BLUMBERG:
Cross-reaction of antibodies to human lactoferrin with HGAg.
Lancet 2: 344 (1974)

221. WALSH, P. N., and J. M. KISSANE:
Nonmetastatic hypernephroma with reversible hepatic dysfunction.
Arch. Intern. Med. 122: 214 (1968)

222. WEGENER, O. H.:
Ganzkörper-Computer-Tomographie.
CEDIP Verlag (1978)

223. WEICHSELBAUM, T. E.:
An accurate and rapid method for the determination of protein in small amounts of blood serum and plasma.
Am. J. Clin. Pathol. 10: 40 (1946)

224. WERF-MESSING, B. van der:
Carcinoma of the kidney.
Cancer 32: 1056 (1973)

225. WETZ, K., und R. R. CRICHTON:
Ferritin. Struktur, Funktion und medizinische Aspekte (Zusammenfassender Bericht aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem).
Blut 27: 275 (1973)

226. WHITE, G. P., M. WORWOOD, D. H. PARRY and A. JAKOBS:
Ferritin synthesis in normal and leukaemic leukocytes.
Nature 250: 584 (1974)

227. WINCKELMANN, G., J. WOLLENWEBER:
Reversible biochemische Serumveränderungen bei Patienten mit hypernephroidem Karzinom.
Dtsch. Med. Wschr.: 1656 (1973)

228. WORWOOD, M., M. WAGSTAFF, B. M. JONES, S. DAWKINS, and A. JACOBS:
Biomedical and immunological properties of human isoferritins.
Aus E. B. BROWN, P. AISEN, J. FIELDING and R. R. CRICHTON (eds.): Proteins of iron metabolism, p. 79.
Grune and Stratton, New York (1977)

229. WRIGHT, G. L. Jr., P. F. SCHELLHAMMER, R. J. FAULCONER:
Isolation of a soluble tumor-associated antigen from human renal cell carcinoma by gradient acrylamide gel electrophoresis.
Cancer Res. 37: 4228 (1977)

230. WU, J. T., A. MADSEN and P. F. BRAY:
Quantitative measurement and chromatography of human urinary carcinoembryonic antigen activity.
J. Nat. Cancer Inst. 53: 1589 (1974)

231. ZÄHRINGER, J.:
Struktur und Funktion von Ferritin.
Aus J. P. KALTWASSER und E. WERNER: Serumferritin, S. 1.
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1980)

An dieser Stelle möchte ich mich besonders herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit bei Herrn Prof. Lamerz bedanken.
Durch seine Anleitung zum selbstständigen experimentellen Arbeiten sowie die unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion über Inhalt und Aussagekraft der einzelnen Experimente hat Herr Prof. Lamerz einen wesentlichen Beitrag zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung geleistet.
Außerdem möchte ich mich für die vielen Anregungen und Impulse, die er der Doktorarbeit gegeben hat, bedanken.

Für die technische Assistenz von Frau Brandt und Fräulein Segura möchte ich mich hier ebenfalls bedanken.

L e b e n s l a u f

Am 3.2.1952 wurde ich in Salzburg als einziges Kind der Frau Marianne Kühn, Modedirectrice, geboren.
Vom 3.9.1958 bis zum 20.7.1962 besuchte ich die Volksschule in Gräfelfing und trat am 3.9.1962 in das Kurt-Huber-Gymnasium in Gräfelfing ein, an dem ich im Mai 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Daraufhin begann ich am 15.10.1971 mein Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach den ersten beiden Semestern bestand ich am 12.10.1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach weiteren drei Semestern am 17.4.1974 die ärztliche Vorprüfung. Auf Grund deren Ergebnisse wurde ich im Juni 1974 von Herrn Prof. Scholz der Studienstiftung des deutschen Volkes vorgeschlagen, die Aufnahme erfolgte im April 1975. Am 25.3.1975 bestand ich den ersten, am 19.4.1977 den zweiten und am 23.5.1978, nach meiner praktischen Ausbildung in der Neurochirurgischen Klinik, der Chirurgischen Poliklinik und der I. Frauenklinik der Universität München sowie dem Städt. Krankenhaus Ingolstadt, den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
Vom Mai 1974 bis zum Februar 1976 (3 Semester lang) war ich neben meinem Studium als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität München tätig.
Vom 15.12.1978 bis zum 31.7.79 arbeitete ich als Assistenzarzt (wissenschaftliche Hilfskraft) an der II. Medizinischen Klinik in Großhadern, vom 1.9.1979 bis zum 31.12.80 beschäftigte ich mich im Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Prof. Hannig, mit der Technik der analytischen trägerfreien Elektrophorese (free flow electrophoresis) und deren methodischer Anwendung auf Probleme der zellvermittelten Immunität.
Mit der vorliegenden Arbeit habe ich im Juli 1975 begonnen und den experimentellen Teil im Dezember 1978 abgeschlossen.